

الجمهورية العربية السورية

جامعة البعث

كلية الهندسة الكيميائية والبترولية

قسم الهندسة الغذائية / تقانة تصنيع الحبوب ومنتجاتها/

تمييز أصناف القمح السوري وفقاً لنوعية البروتين

Identification of Syrian wheat cultivars According to protein analysis

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الغذائية – تقانة تصنيع الحبوب

إعـــداد

المهندس انطون بـــولص الخوري

إشـــراف

الدكتورة المهندسة رنـــا مصطفى

الجمهورية العربية السورية

جامعة البعث

كلية الهندسة الكيميائية والبترولية

قسم الهندسة الغذائية

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث قام به المهندس انطون الخوري تحت إشراف الدكتورة المهندسة رنا مصطفى في قسم الهندسة الغذائية في كلية الهندسة الكيميائية والبترولية بجامعة البعث، وأي رجوع إلى بحث آخر في هذا الموضوع موثق في النص.

تاريخ ٢٥-٣-٢٠١٠

المرشح	المشرف
م.انطون الخوري	الدكتورة رنا مصطفى

CERTIFICATE

It is here certified that the work described in this thesis is the result of the author's own investigation under the supervision of Dr. Rana Mustafa from the department of Food Engineering, Faculty of Chemical & Petroleum Eng , AL-Baath University, and any reference to researchers work has been duty acknowledged in the text,

Date 25-3-2010

Supervisor	Food.Eng
Dr. Rana Mustafa	Anton AlKhoury

تصريح

أصرح بأن هذا البحث (تمييز أصناف القمح السوري وفقاً لنوعية البـــروتين) لــم يســبق أن قبــل للحصول ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

تاريخ ٢٥-٣-٢٠١٠

المرشح

انطون بولص الخوري

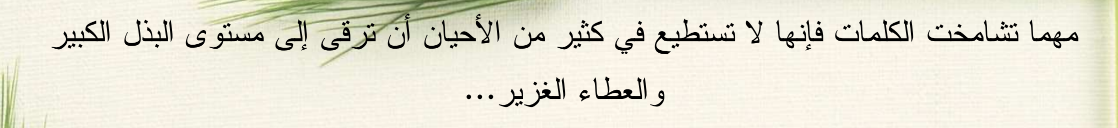
DECLARATION

It is here declared that this work (**Identification of Syrian wheat cultivars According of protein analysis**) has not already been accepted for any degree , nor is it being Submitted currently for any other degree

Date 25-3-2010

Food Eng

Anton Bolos AlKhoury



كلمة شكر

مهما تشامخت الكلمات فإنها لا تستطيع في كثير من الأحيان أن ترقى إلى مستوى البذل الكبير والعطاء الغزير...

كلمة شكر ترف بأجنحة المشاعر الصادقة لا بد من إزجائها لكل الجهود التي قدمت ...

كل الاحترام والمحبة للدكتورة المهندسة رنا مصطفى التي قدمت كل جهد لإغناء هذا العمل فكانت مشعلاً أنار الدرب...

فائق الاحترام والتقدير للدكتور المهندس فرحان ألفين الذي كان لتوجيهاته الأثر الكبير لوصول السفينة بر الأمان فكان خير رُبّان...

ونشكر كل من قدم لنا يد المساعدة في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة والهيئة العامة للبحوث الزراعية ومركز البحوث الزراعية بحمص.

نقدم كل الشكر والمحبة للعاملين في كلية الهندسة الكيميائية والبترولية من دكاترة ومهندسين وإداريين على كل دعم قُدم لإنجاح هذا العمل..

المهندس

انطون بولص الخوري

إهداء

نعمل كي لا تضيع جهود من ربّى وكبّر

إهدائي وشكري الأول ....

إلى من غاب عنا جسداً...

وبقيت روحه ترفرف حولنا تحمينا وتحملنا إلى كل ما فيه خير

إلى روح العمل والتفاني ...

إلى قطرات العرق التي بُذلت ...

إلى إنسان قبل أن يرحل علمنا...

أنّ أسمى ما في الحياة أن تعمل لمن يأتي بعدك

فشكراً أقولها لمن أسس لنا كي نكون....

فعلنّا نكون لنؤسس...

وأقول لكم هذا ثمر دعمكم

يا من رضاكم طموحي ...ومحبتكم أملي وزادي

سنبقى نعمل معاً حتى تُزهر هذه الدنيا بنوّارها وأصدقائه...

انطون **بولص الخوري**

تمييز أصناف القمح السوري وفقاً لنوعية البروتين

الملخص

كان الهدف من هذا البحث استخلاص غليادين وغلوتينين القمح وتجزأتها بتقنية الرحلان الكهربـــائي وتفسير النتائج ضوء ارتباطها بالظروف البيئية والوراثية، وتحديد مدى ملاءمة هذه الطريقة لتمييـــز أصناف القمح المزروعة في سورية. شملت الدراسة سبعة عشر صنفاً من أصناف القمـــح الشـــائع زراعتها في سورية، بنوعيها الطري والديورم والتي أخذت من عدة حقول اختباريه لمراكز بحثيـــة معنية بتطوير زراعة القمح موجودة في سورية ومن موسمي نمو 2008-2007.

تم استخلاص الغليادين والغلوتينين من عينات القمح المختلفة، ومن ثـــم جُـــزّأت هـــذه البروتينـــات المستخلصة بتقنية الرحلان الكهربائي على جل بولي أكريل أميد بوجود دودسيل سلفات الصـــوديوم SDS-PAGE. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن وحدات الغليادين والغلوتينين التي تعـــود لصنف قمح واحد هي ثابتة عدداً وكثافةً، ولا تتعلق بظروف نمو النبات أو بطريقة الزراعـــة، كمـــا لوحظ التمايز بين أصناف القمح من خلال عدد هذه الوحدات و كثافتها و ترتيبها، ويمكن الاســـتفادة من هذه النتائج في برامج تربية القمح لتحسين أصناف القمح السوري واستنباط أصناف جديدة محسنة إذ يُعطي تحليل بروتينات القمح التخزينية وفق تقنية الرحلان الكهربائي معلومات قيّمة حول هويـــة الصنف وبنيته الوراثية.

وتبين أيضاً أنه يمكن تمييز أصناف القمح الديورم عن أصناف القمح الطري بالاعتماد على العصابة γ-45 التي توجد فقط في مخططات تجزئة غليادين أصناف القمح الديورم، كما ولوحظ الاختلاف في عدد وترتيب وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW مابين أصناف القمح المدروسة، وهذا يفيد في تحديد هوية صنف القمح والتنبؤ بالخواص الريولوجية للعجين ونوعية المنتجات الخبزية.

تأتي أهمية هذا البحث من كونه يركز الاهتمام على استخدام تقنية الرحلان الكهربائي كطريقة حديثة لتصنيف القمح السوري، وتحديد هوية كل صنف وفقا" لعدد وترتيب الوحدات البروتينية (الغليـــادين والغلوتينين) المفصولة.

الكلمات المفتاحية: القمح ، الغليادين، الغلوتينين، الرحلان الكهربائي SDS-PAGE، تحديد الصنف

Identification of Syrian wheat cultivars According to protein analysis

Abstract

The aim of the present work was to separate and subsequent separate the wheat gliadin and glutenin by electrophoresis techniques, furthermore to determine whether significant correlation exist between electrophoresis results and environments conditions or genetic structure.

Wheat grains of seventeen soft and durum Cultivars were collected from three different ecological regions of Syria and from two different crop years (2007-2008). The variability of seed storage-proteins (gliadin-glutenin) was analyzed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Electrophorogram for each Cultivar was scored and presence or absence of each band noted.

The results demonstrated that the intensity and number of band patterns (electrophoregrams) for the same cultivar were similar and characteristic of the genotype and they were also independent of growth and environment conditions (not affected by growth locations or crop years). Moreover, the electrophoretic analysis showed differences in number, order and intensity of gliadin and glutenin subunits between different cultivars, could be useful markers in classification of cultivars, thereby improving the efficiency of wheat breeding programs in cultivar development in Syria.

Besides, it is concluded that gliadin electrophoregrams could be useful for discrimination the variety of wheat (durum, soft) based on presence or absence of band (γ-45), and was characterized molecular weight-Gluten Subunits (HMW) could be useful to predict bread and durum wheat quality.

This study established for the use of electrophoresis for new grading system to Syrian wheat variety identification based on gliadins and glutenin fractionation by electrophoresis**.**

Keyword: Wheat, gliadin, glutenin, SDS-PAGE electrophoresis, varietal identification

أهمية البحث وأهدافه:

أجريت دراسات عديدة في مراكز الأبحاث العالمية بهدف تطوير طرائق التمييز بين أصناف القمـــح، وقد تناولت الكثير من هذه الأبحاث تجزئة بروتينات القمح بواسطة الرحلان الكهربائي بهدف التمييز بين أصناف القمح وتحديد هوية كل صنف من الأصناف المزروعة. كما أجريت بعــض الأبحـــاث للتمييز بين القمح الديورم والطري بواسطة الرحلان الكهربائي بهدف كشف غش منتجات المعكرونة و السميد بالقمح الطري، واستخدمت تقنية الرحلان الكهربائي أيضاً للتنبؤ بـــالخواص التكنولوجيـــة للقمح.

نظرا" لأهمية القمح الاقتصادية والغذائية وكونه من أهم المحاصيل الحقلية المزروعة في سورية، قمنا باستخدام تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE لتجزئة بروتينات بعض أصناف القمح الســوري بهدف تحديد هويتها، ويعد هذا البحث من الدراسات الأولى على المســتوى المحلــي التــي قامــت باستخدام طريقة الرحلان الكهربائي لتحديد قدرتها على تمييز أصناف القمح السوري لتكون بديلاً عن الطرائق المستخدمة حالياً والتي تعتمد في أغلبها على تحديد الصفات المورفولوجية للقمح. من ناحية أخرى، فإن كشف الغش في القمح المستورد أو في منتجات المعكرونة غير كافٍ بالوسائل المتبعــة حاليا". لذلك تم التركيز في هذا البحث على دراسة بعض أصناف القمح لتكون هذه الدراسة مــدخلا" لأبحاث أخرى على جميع أصناف القمح المزروعة في سورية، ويمكن تلخيص أهداف هذه الدراســة بالنقاط التالية:

١. تجزئة البروتينات التخزينية لبعض أصناف القمح السوري وفق تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE

٢. دراسة تأثير بعض الظروف على نتائج الرحلان الكهربائي (سنة النمو، الموقع الجغرافي).

دراسة إمكانية الاعتماد على نتائج الرحلان الكهربائي في تمييز أصناف القمح المدروســة والتنبــؤ بالخواص التكنولوجية لها.

الصفحة	الشكل
٢	الشكل (١): البنية التشريحية لحبة القمح
٨	الشكل (٢): تركيب الغلوتين
٣٠	الشكل (٣): آلية تشكيل بوليمير الأكريل أميد
٥٠	الشكل (٤) منحني المعايرة للبروتينات القياسية
٥٢	الشكل (٥): تأثير الموقع الجغرافي على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غليادين أصناف القمح شام١، شام٣، شام٥، شام١٠، من مواقع (دمشق، حلب، حمص
٥٤	الشكل (٦): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي لغليادين لأصناف القمح (شام١٠، شام٥، شام٣، شام١) ببرنامج Scion Image
٥٥	الشكل (٧): نسبة التشابه والارتباط بين أصناف القمح المدروسة (شام١، شام٣، شام٥، شام١٠)
٥٧	الشكل (٨): تأثير الموقع الجغرافي على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غلوتينين أصناف القمح (شام١، شام٣، شام٥، بحوث٧) من مواقع (دمشق، حلب، حمص)
٥٨	الشكل(٩)تأثير الموقع الجغرافي على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غلوتينين عينات صنف القمح (شام١٠) من مواقع (حمص، دمشق، حلب
٥٩	الشكل (10-A): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغليادين صنف القمح (بحوث ٧، من مواقع دمشق- حمص)
٦٠	الشكل (10-B): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغليادين أصناف القمح (شام١، شام٣، شام ٥، شام ١٠ من مواقع دمشق- حمص-حلب)
٦١	الشكل (١١): نسبة التشابه والارتباط لعينات صنف القمح شام١٠، والمأخوذة من ثلاثة مواقع جغرافية (حمص، حلب، دمشق)
٦٤	الشكل (١٢): تأثير اختلاف سنة النمو على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غليادين أصناف القمح (دوما١، جولان٢، بحوث٧، شام٤، شام٨) من موسمي (٢٠٠٧، ٢٠٠٨)
٦٦	الشكل (١٣): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي لغليادين بعض أصناف القمح (شام ٤، شام ٨، دوما١، بحوث٧، جولان٢) من موسمي نمو (٢٠٠٨،٢٠٠٧) ببرنامج Scion Image
٦٧	الشكل (١٤): نسبة التشابه والارتباط بين عينتين صنف القمح شام٤ من موسمي (٢٠٠٧، ٢٠٠٨) التيتم تجزئتها على جل الفصل ذاته
٦٨	الشكل (١٥): تأثير اختلاف سنة النمو على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غلوتينين أصناف القمح (دوما٢، جولان٢، شام٦، شام١٠) من موسمي (٢٠٠٧، ٢٠٠٨
٦٩	الشكل (١٦): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغلوتينين أصناف القمح (شام٦، شام١٠، جولان٢، دوما٢) من موسمي نمو (٢٠٠٧، ٢٠٠٨)
٧٢	الشكل(١٧): جل الرحلان الكهربائي لغليادين بعض عينات أصناف القمح المدروسة وصنفي القمح الطري (Opata وPitic)

المختصرات

SDS- PAGE : Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis

الرحلان الكهربائي على هلام البولي أكريل أميد بوجود دودسيل سلفات الصوديوم

ISO : International Standard Organization

المنظمة العالمية للمواصفات العيارية

ISTA : International Seed Testing Associotion

الجمعية الدولية لاختبارات البذور

FAO : Food Agricultur Organization

منظمة الأغذية والزراعة العالمية

ICC : International Association for Cereal Science and Technology

الجمعية الدولية لعلوم وتكنولوجيا الحبوب

HMW : High Molecular Weigh of glutenin

وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي

LMW : Low Molecular Weigh of glutenin

وحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي

المقدمة

يعتبر القمح أكثر أنواع الحبوب زراعةً في العالم، وقد ازداد إنتاجه في الأعوام الخمسين الماضية بشكل كبير، إذ يبلغ الإنتاج العالمي للقمح حوالي ٦٠٠ مليون طن سنويا" (FAO, 2009) وتعتبر الصين والهند والولايات المتحدة وروسيا وفرنسا وكندا واستراليا من أهم الدول المنتجة له.

يعتقد العلماء أنّ أنواع النباتات البرية ذات الصلة بالقمح قد نشأت أولاً في الشرق الأوسط وهي أسلاف جميع أنواع القمح المزروع حاليا". وقد كان القمح من أوائل النباتات التي زُرعت، حيث وَجد علماء الآثار في الشّرق الأوسط بقايا حبوب قمح ترجع إلى ٩٠٠٠-١١٠٠٠ ق.م. وقد تطوّرت أنواع قمح جديدة تدريجياً نتيجة التلقيح العشوائي بين القمح المزروع والحشائش البرية، ولما كانت لبعض أنواع القمح الجديدة صفات فَضّلها المزارعون، فقد بدأت هذه الأنواع تحلّ محل الأنواع القديمة.

ربما كان القمح الذي زرعته الشعوب الأولى، لا يختلف كثيرا" عن السلالات البرية، إلا أن أصناف القمح المنتجة حديثاً تتميز بوضوح عن أي نبات بري إلى درجة تطلبت إجراء الكثير من البحوث لتحديد أصله.

يقوم العلماء في المختبرات وفي محطات البحوث الزراعية والجامعات، باستنباط أصناف جديدة بطريقة التهجين، وفيها تستعمل حبوب اللّقاح من أحد الأصناف لإخصاب نباتات صنف آخر، ويشكل الناتج صنفًا جديداً يحمل بعض الخصائص من كلا الأبوين، وتتم زراعة البذور الجديدة النّاتجة من الهجين لعدة أجيال، وذلك لزيادة درجة النقاء والتأكد من ثبات الصفات المرغوبة للصنف الجديد.

خلال القرن العشرين استنبط العلماء أصنافاً جديدة من القمح حيث يوجد ما يزيد على ٣٠,٠٠٠ صنف من القمح في العالم، تختلف في خصائصها، ويُحدد ذلك إنتاجه وموسم نموه ، ومحتوى بروتينه، وقدرته على مقاومة البرد والجفاف والمرض والآفات الحشرية، منها ما يُزرع في السهول، وآخر يتلاءم مع المناطق الجبلية، بعضها تجود زراعته في الأجواء الحارة وبعضها الآخر في

الأجواء الباردة. وقد أنتجت في السنين الأخيرة سلالات يمكن أن تنمو جيدا" حتـــى فـــي ألاســـكا أو سيبريا. ومن تلك الأصناف ما يصلح لصنع الخبز ومنه ما يصلح لإنتاج النـــودلز أو المعكرونـــة أو المعجنات.

يحتل القمح في الجمهورية العربية السورية المرتبة الأولى بين الحبوب من حيث المساحة المزروعة والإنتاج، وقد ارتفع إنتاج سورية من القمح خلال تسعينات القرن الماضي من ٢ مليون طن إلـــى ٤ مليون طن تقريباً وذلك لعدة أسباب منها اعتماد أصناف جديدة محسنة ذات غلة مرتفعـــة والاعتمـــاد على التقانات الزراعية بشكل متزايد من قبل الفلاحين.

يحظى حاليا" تصنيف القمح باهتمام بالغ من قبل الباحثين السوريين، حيث بـــدأت مراكـــز الأبحـــاث الموجودة في سورية (الإيكاردا، الهيئة العامة للبحوث الزراعية بدوما وغيرها) بـــإجراء دراســـات معمقة بهدف تمييز أصناف القمح المتوفرة لديها وذلك بطرق حديثة ومتطورة وهذا كان أيضا" هدف دراستنا، فقمنا بتجزئة غلوتين بعض أصناف القمح السوري بواسطة الرحلان الكهربائي بهدف تمييز بعض أصناف القمح السوري وتحديد هويتها بدقة، ويعتبر هذا من الأمور الهامة لمربي القمح، وتعد طريقة الرحلان الكهربائي الطريقة التحليلية الأكثر كفاءة وخاصة فـــي مرحلـــة التربيـــة واســـتنباط السلالات نظراً لما تتطلبه هذه المرحلة من تحديد دقيق للأنماط الوراثية لبنية البذرة، حيـــث يُعطـــي تحليل بروتينات القمح التخزينية وفق تقنية الرحلان الكهربائي معلومات قيّمة حول هويـــة الصـــنف وبنيته الوراثية. وقد استخدمت هذه التقنية منذ عشرات السنين في العديد من الدول الأوروبية وكل من كندا وأمريكا وأستراليا وحديثاً في الأرجنتين والبرتغال ومصر والعراق وإيران وتركيا لتحديد هوية أصناف القمح المزروعة في تلك البلدان، لكنها من المحاولات الأولى على المستوى المحلي والتـــي تهدف إلى التمييز بين أصناف القمح والتنبؤ بنوعية غلوتينها بالاعتماد على نتائج تجزئة بروتينـــات القمح التخزينية وفق تقنية الرحلان الكهربائي SDS- PAGE.

الفصل الأول

القمح

Wheat

١-١- مقدمة *Introduction:*

تحتلّ الحبوب من ناحية الإنتاج والاستهلاك المرتبة الأولى مقارنة بأنواع المواد الغذائية الأخـرى، ويشـكل القمح الغذاء الرئيسي لكثير من شعوب العالم، لا ينافسه في هذا المجال إلا الـذرة والأرز. وهـو مـن أهـم المحاصيل الحقلية، إذ أن أكثر من ثلث سكان العالم يعتمدون في غذائهم على القمح كونه مادة خام أولية للكثير من المنتجات الغذائية (الخبز والمعكرونة والنودلز والكيك والبسكويت والحلويات والمعجنـات وغيرهـا..) (Poehlman and Sleper, 1995). وتعتبر المنتجات المصنعة من القمح مصـدر هـام للكربوهيـدرات والألياف والبروتين وغيرها من المواد الأساسية كالمعادن والفيتامينات (Halverson and Zeleny, 1988).

١-٢- تركيب حبة القمح *Kernel Structure:*

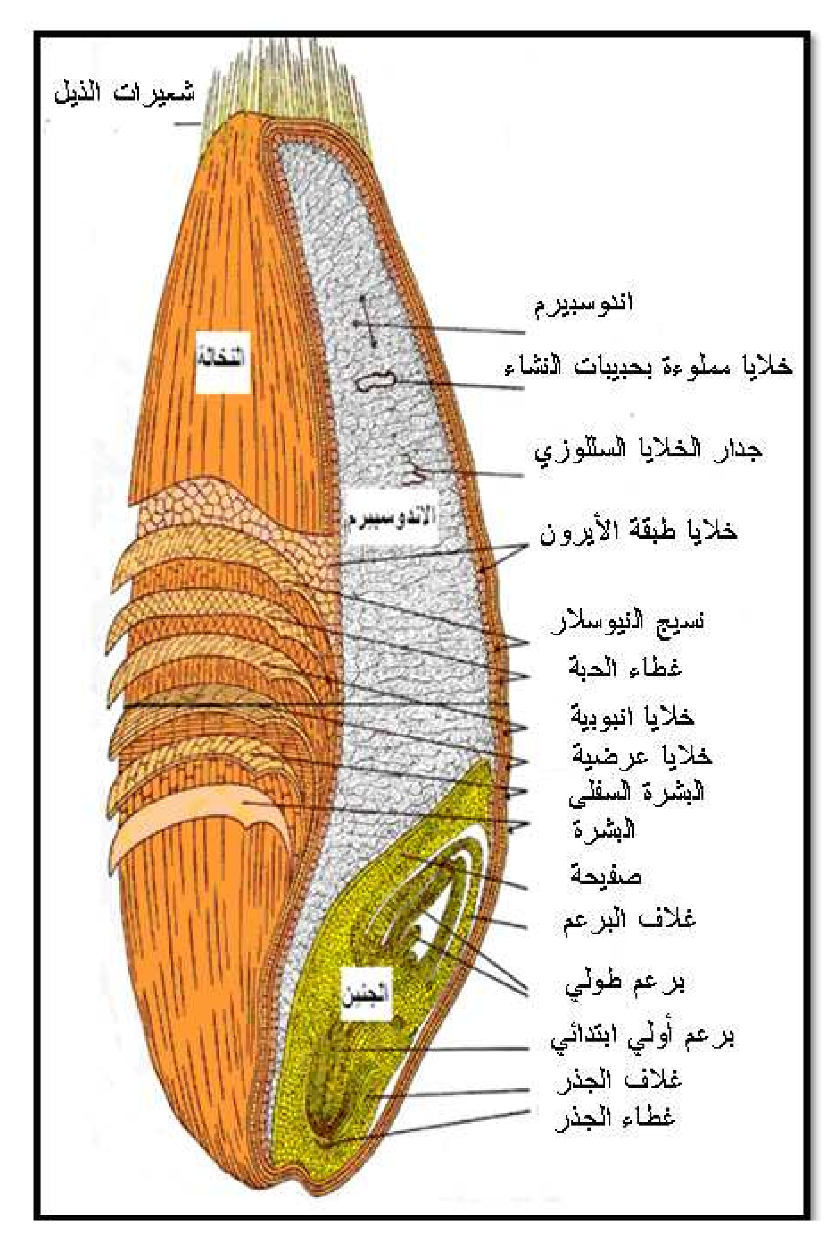
١-٢-١ التركيب التشريحي لحبة القمح (الشكل١)

يمكن تقسيم البنية التشريحية لحبة القمح كالتالي:

١- الجنين أوالرشيم *Germ (embryo):* يشكّل 3% من وزن الحبة.

٢- الاندوسبيرم *Endosperm*: : وهو مكان التخزين في حبة القمح والمكوّن الأهم فيها ونسبته 82% من وزن الحبة، وتتركّب خلاياه من النشاء والبروتين، حيث يكون النشاء على شكل حبيبـات عدسـيّة أو كروية متراصّة وملتصقة مع بعضها بشدّة يملأ البروتين المسافات ما بينها، ويمكن اعتبار البروتين كطور شبكي مستمر والنشاء مغمور ومغموس به.

٣- الأغلفة *Bran:* ويُطلق عليها اسم النخالة وتشكّل 15 % من وزن الحبة (كيالي وعياش، ١٩٨٦)



الشكل (١): البنية التشريحية لحبة القمح.(الصالح، ١٩٩٦)

١-٢-٢ التركيب الكيميائي لحبة القمح (جدول١، ٢)

تتكوّن حبة القمح من المكوّنات الرئيسية التالية:

١- **الماء:** يعتبر محتوى القمح من الماء مهماً من الناحيتين التجارية والتخزينية، ويتعلّق هذا المحتوى بالشروط الجوّية وكيفية تخزين القمح ورطوبة جو التخزين.

٢- **البروتين:** يتأثر محتوى حبة القمح من البروتينات بأمرين اثنين هما : التركيب الوراثي للنبات والظروف المناخية المحيطة خلال فترة نمو وتطور الحبة، ويتراوح محتوى البروتين في القمح بين -6 (22)% وبشكلٍ عام يتميز القمح المنتج في بيئة جافة بمحتوى بروتين أكثر من القمح المنتج في بيئة ماطرة.

٣- **الليبيدات:** تتراوح نسبته في جنين القمح (6-11)% وفي النخالة (3-5)% وتكون في أندوسبيرم حبة القمح (0.8-1.5)%.

٤- **الفيتامينات:** تحتوي حبوب القمح على مجموعة فيتامينات، ومن أهمها فيتامينات B وهي تتوزّع بشكل غير متناسق في أجزاء حبة القمح، ويحتوي القمح كذلك على α،β،γ وتترا توكوفيرول.

٥- **المعـادن:** تتعلق بكمية المعادن الموجودة في التربة وكمية ونوعية الأسمدة المستخدمة ويتراوح هذا المحتوى في حبة القمح ضمن المجال (1.3-2.5)%.

٦- **الكربوهيدرات:** تشكّل الكربوهيدرات النسبة العظمى لمكونات الحبة، حيث يتصدّر النشاء هذه المكوّنات وتختلف نسبته من صنف لآخر حيث يتراوح بين (60-68)% من وزن الحبة. كما تعدّ الألياف من المركبات الكربوهيدراتية المعقّدة التي توجد في الطبقات الخارجية المغلّفة للحبة وتتراوح نسبتها (-2 2.7)% (المصري والخياط،١٩٩١)

جدول (١): التركيب الكيميائي لحبوب القمح على أساس الوزن الجاف (MCINTOSH, 2004).

المكـــــوّن	النسبة %
بروتين (N x 5.7)	14.0
رماد	1.9
ليبيدات	2.1
كربوهيدرات	66.9
ألياف	2.6
رطوبة	12.5

جدول (٢): التركيب الكيميائي لأجزاء حبة القمح (%) (حسين، ٢٠٠٣).

جـــــزء الحبة	من الحبة الكاملة	نشاء	بروتين	الألياف الخام	الألياف الغذائية	دهن	رماد
النخالة	15	0	20	93	70	30	67
أندوسبيرم	82	100	72	4	27	50	23
الجنين	3	0	8	3	3	20	10

نلاحظ من خلال الجدول السابق أن النشاء يتركّز في الأندوسبيرم بينما لا يوجد في كلٍ من النخالة والجنـــين، أما بالنسبة للبروتين فنلاحظ أنّ نسبته العظمى تكون في الأندوسبيرم 72 % بينما أقل نسبة للبروتين تكون في الجنين، وكما يبيّن الجدول تركّز الألياف والرماد في النخالة أكثر من الأجزاء الأخرى.

من جهة أخرى فإن تركيب حبوب القمح يتأثر بعدة عوامل أهمها نوع وصنف القمح، العوامل الجوية (كميـــة الأمطار، درجة الحرارة)، كما يختلف حسب الموسم والتسميد ونوع التربة والرطوبة.

١-٣ بروتينات القمح Wheat protein

حسب تصنيف Osborne (1907) يوجد خمسة أنواع رئيسية من البروتينات، تختلف في قابليتهــا للانحـــلال بالمذيبات، وهي :الألبومـــينات Albumins التي تنحل في الماء، والغلوبولينات Globulins المنحلـــة فـــي المحاليل الملحية (Wrigley and Bietz, 1988; Macritchie, 1992) وتتواجد هذه البروتينات في الجنين وطبقة الأليرون من حبة القمح (Pomeranz, 1988) أما البرولامينـــات Prolamins (غليـــادين القمـــح) والغلوتيلينات Glutelins (غلوتينين القمح) والتي تدعى بمجموعها بالبروتينات التخزينية فهـــي تتركـــز فـــي أندوسبيرم حبة القمح (Shewry *et al*, 1995; Shewry and Tatham, 1990). وتنحـــل الغلوتيلينـــات بالمحاليل الحمضية والقلوية بينما تنحل البرولامينات بالكحول (Wrigley and Bietz, 1988; Macritchie, 1992) أما الجزء الأخير فهو جزء متبقي لا ينحل بالمذيبات السابقة.

١-٤ الغلوتين

يتميز دقيق القمح بكونه الوحيد من بين دقيق الحبوب الأخرى القادر، عند خلطه بالماء، على تشـــكيل عجينـــة متماسكة القوام لها درجة عالية من المرونة elasticity والمطاطية أو الانسيابية extensibility والمســـؤول عن هاتين الصفتين هما الغليادين والغلوتينين واللذين يشار إليهما بـ "غلوتين القمح" والذي يشكل 85% مـــن الكمية الكلية لبروتينات الدقيق (Eliasson and Larsson, 1993).

لقد حظي معقد الغلوتين بالكثير من الدراسة والبحث منذ أكثر من 250 عاما" للوقوف على تركيبه وطبيعتـــه وطريقة تكوينه والتحكم في خصائصه وعلاقته بالخواص الخبيزية للقمح. بدأ أولى هـــذه الدراســـات العـــالم Jacopa Beccari أستاذ الكيمياء في جامعة بولونيا عام 1745، الذي أوضح بأن الطحين يتكون من قســـمين رئيسيين: القسم الأول ينحل بالماء وهو النشاء، أما القسم الثاني فهو لزج وغير منحل بالماء وهو الغلوتين. بيَن فيما بعد العالم Parmentier عام 1773 أن الغلوتين ينحل بالخل، وفـــي عـــام 1805 أثبـــت Einhof بـــأن

الغلوتين ينحل بمحلول مائي كحولي، أما Taddei فقد تمكن عام 1918 من فصل الغلوتين إلى جزأين أحدهما ينحل بالكحول والآخر غير منحل فيه. كانت تلك الدراسات القاعدة التي اعتمد عليها Osborne 1907 في تقسيم البروتينات بحسب قابليتها للانحلال بالمذيبات كما ذكرنا سابقا".

١-٤-١- الغلوتينين

يتكون الغلوتينين من مجموعة من تحت الوحدات البروتينية التي ترتبط مع بعضها (بشكل أساسي) بروابط ثنائية الكبريت، يتميز الغلوتينين بانحلالية ضعيفة وذلك بسبب بنيته البوليميرية ووزنه الجزيئي المرتفع الذي يتراوح من 100 ألف وقد يصل إلى عدة ملايين دالتون (Southan and Macritchie,1999). عندما يُعامل الغلوتينين بمواد تفكك الجسور الكبريتية مثل كبريتات دوديسيل الصوديوم، وعامل مرجع مثل β- Mercaptoethanol فإنه يتجزأ عند فصله وفق تقنية الرحلان الكهربائي إلى مجموعتين من الوحدات البروتينية هما: وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW التي يتراوح وزنها الجزيئي ما بين (60-130 KDa)ويرمز لها بالحرف A، ووحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي LMW والتي لاتتجاوز أوزانها الجزيئية 40 KDa (Duponta and Altenbach, 2003) وتقسم أيضا" إلى ثلاثة مجموعات يرمز لها بـ D, B, C (مرتبة من الأسرع إلى الأبطء على جل الفصل).

وقد تم وضع نظام ترقيم، لتمييز العصابات الممثلة للوحدات البروتينية المفصولة، يعتمد على سرعة تحركها على جل الفصل (Payne and Lawrence, 1983; Payne *et al*., 1987)، حيث أن الأرقام تزداد مع زيادة الحركة النسبية للعصابات الظاهرة على جل الفصل R_F، واستمر العمل وفق هذا النظام من قبل جميع الباحثين العاملين في مجال تربية القمح، وتم تحديد المورثات المسؤولة عن تشكيل هذه الوحدات البروتينية (جدول٣).

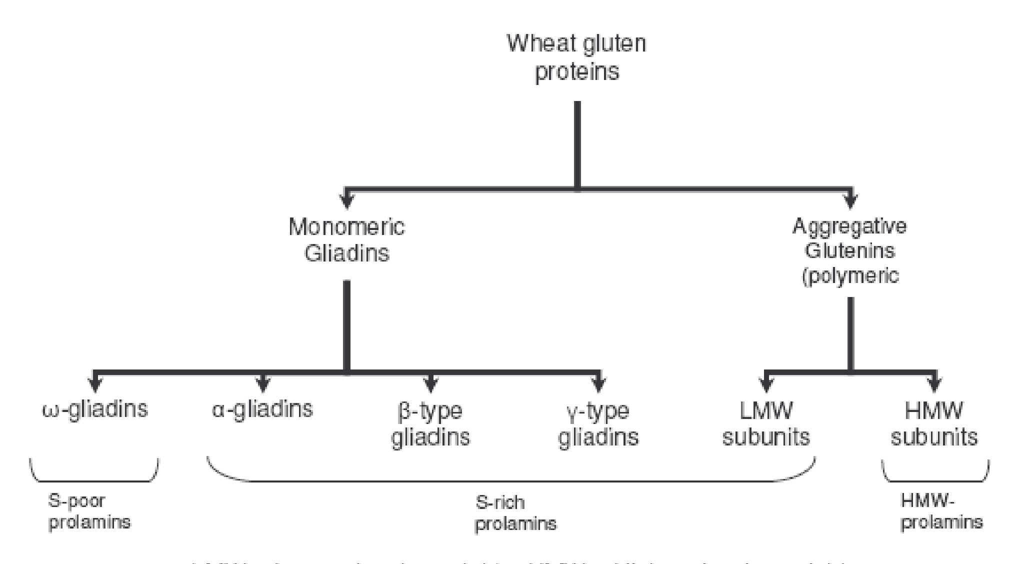
جدول (٣): نظام تسمية وحدات الغلوتينين HMW المفصولة بالرحلان الكهربائي مع اسم المورثة المسؤولة عن كل تحت وحدة بروتينية (Payne and Lawrence, 1983; Payne *et al*, 1987)

رقم العصابة (Band)	مكان توضع المورثة على الكروموزوم (locus)
Band1 Band2* No band	Glu-A1
Bands 6 + 8 Bands 7 + 8 Bands 7 + 9 Band 7 Bands 13 + 16 Bands 14 + 15 Bands 17 + 18 Band 20	Glu-B 1
Bands 2 + 12 Bands 3 + 12 Bands 4 + 12 Bands 5 + 10	Glu-D1

١-٤-٢- الغليادين (برولامين القمح):

يتكون الغليادين من سلاسل بولي ببتيدية أحادية (مونوميرات) ذات أوزان جزيئية منخفضة نسبياً (Bietz and Wall, 1972) ، وقد تم تجزئة الغليادين إلى عدد من البولي ببتيدات وفق تقنية الرحلان الكهربائي عند pH حامضي باستخدام جل النشاء (Jones *et al*., 1959) ووزعت إلى أربع مجموعات بحسب وزنها الجزيئي الذي يتوافق مع حركتها على جل الفصل وهي من الأسرع إلى الأبطأ α- β- γ

غليادين والتي يبلغ الوزن الجزيئي لها 30-40 KDa و ω–غليـــادين ذات الـــوزن الجزيئـــي60-80 KDa (Ewart, 1973) (الشكل٢)، تتشابه هذه المجموعات الأربعة بتركيب الحموض الأمينية إلا أن نســبة هــذه الحموض الأمينية تختلف، حيث يزداد تواجد الحموض الأمينية القاعدية من ω – غليادين باتجاه α– غليادين على خلاف الغلايسين الذي يتناقص بدءاً من ω – غليادين باتجاه α – غليادين أما بالنســبة للبــرولين فهــو يتواجد في ω – غليادين بنسبة 31% أعلى منه في γ – غليادين ولكن ليس أعلى بكثير مــن α – غليـــادين. وتتواجد الحموض الأمينية الكبريتية في ω – غليادين بنسبة أعلى من وجودها فـــي بقيـــة أنـــواع الغليـــادين (Pomeranz, 1988).



الشكل (٢): تركيب الغلوتين (Shewry and Lookhart, 2003; Shewry and Tatham, 1990)

أجريت دراسات عديدة لتمييز المورثات المسؤولة عن وحدات الغليادين الظاهرة في شريط الرحلان الكهربائي وتبين أن مجموعة المورثات (Allelic) التي تتوضع على الأذرع القصيرة للمجموعة الصبغية الأولى Gli-1 للمورثات الثلاث ($Gli\text{-}A_1$, $Gli\text{-}B_1$, $Gli\text{-}D_1$) هي المسؤولة عن العصابات التي تظهر في منطقـــة ω وγ– غليادين (جدول٤)، بينما العصابات β وα وبعض من وحدات γ–غليادين توسم من قبل المورثات المتوضعة علـــى الأذرع القصـــيرة للمجموعـــة الصـــبغية السادســـة ($Gli\text{-}A_2$, $Gli\text{-}B_2$, $Gli\text{-}D_2$). (Payne 1987; Caballero *et al* ., 2004).

ويعتبر التوضع $Gli\text{-}B_1$ هو الأهم كونه المسؤول عن ظهور العصابة γ-45 غليادين (أي العصابة γ−غليادين التي تقطع مسافة تبلغ %45 من مسافة الهجرة الكلية على جل الفصل) التي يدل وجودها على نوعية غليادين ممَيزة للقمح الملائم لصناعة المعكرونة كما سيرد لاحقا" (Edurnea *et al*, 2006).

جدول (٤): نظام التسمية الخاص بوحدات الغليادين المفصولة بالرحلان الكهربائي مع اسم المورثة المسؤولة عن كل عصابة بروتينية (Konarev *et al*, 1979).

اسم تحت وحدات الغليادين ورقم العصابة		المورثة
α	2	6A
	4	6A
	6	6D
	7	1B(S)
β	3	6B(S)
	4	6B(S)
	5	6B(S)
γ	2	1B(S)+6B(S)+1D(S)
	3	1D(S) +1A+1A(S)
	5	1A+1A(S)
ω	3	1B(S)
	4	1B(S)
	5	1B(S)
	7	1D(S)
	8	1D(S)
	9	1D(S)

الفصل الثاني

تصنيف القمح

Wheat varietal Classification

٢-١- التصنيف النباتي للقمح Taxonomy:

ضمن المملكة النباتية (*Kingdome*) يعتبر القمح من العائلة النجيلية (*Graminaceae*) وشـعبة مسـتورات البذور و طائفة أحاديات الفلقة، تحت الفصيلة الهشيمية (*Festuciodeae*)، وجنس (*Triticum*) ومن أهم أنواعـه: *T. aestivum, T. compactum , T. dicoccoides, T. durum , T. monococcum , T. spelta* (Dewey,1984)

٢-٢- التقسيمات المختلفة للقمح Wheat Classification:

يوجد الآلاف من الأصناف المزروعة (*Cultivar*) من القمح والتي تختلف عن بعضـها بسـبب الشـروط الطبيعية (المناخ والتربة) أو بسبب أعمال التهجين و التحسين.

لقد تحققت أكبر الإنجازات أهمية في تاريخ إنتاج القمح بفضل طرق التحليل الدقيقة، ووسائل التلقيح العلميـة الحديثة التي أدت إلى استنباط أصناف قمح جديدة. كما إن اكتشاف مستويات التضاعف الثلاث لأصناف القمح من قبل Sax في عام 1918، قد ساهم بشكل كبير في تطوير التصنيف الحديث وحلّ جزءاً كبيراً من مشـكلة توصيف أصناف القمح.

ينظر للقمح من قبل المزارع على أنه محصول زراعي، أما بالنسبة للتاجر فهو سلعة، وللطحان حبوب طحن، ولأصحاب المخابز طحين للخبز، وكلٍ منهم يحدد صنف القمح وفق خبرته الشخصية بـالنظر إلـى بعـض المؤشرات الهامة، بناء" على ذلك، وجدت بعض التقسيمات التجارية بهدف تسهيّل عملية تبادل هذه المادة بين المزارعين والتجّار والمنتجين.

٢-٢-١ تصنيف القمح بحسب العدد الصبغي **Ploidy level Classification:**

تنتمي جميع أصناف القمح المزروعة إلى جنس *Triticum*، وتنقسم إلى ثلاث مجموعات بحسب عدد الصبغيات في الخلية الجسمية في نبات القمح ويعتبر هذا التقسيم الأهم في برامج تربية القمح (McIntosh, 2004; Kihara, 1954; Tsunewaki *et al*., 1990)

- مجموعة أصناف القمح وحيد الحبة Einkorn Group وهي أصناف ثنائية المجموعة الصبغية (Diploids)، تحوي كل خلية جسمية على مجموعتين من الصبغيات واحدة من الأب والثانية من الأم (AA).

$$2n = 2x = 2*7 = 14 \text{ Chromosome (صبغي)}$$

x: العدد الأساسي للصبغيات في الخلية الجسمية وهو 7 صبغيات

2n : العدد الصبغي في الخلية ويضم 7 أزواج من الصبغيات

تشمل هذه المجموعة الأنواع البدائية من القمح، وعنه نشأت المجموعات المتضاعفة الأخرى، والأصل البري لأصناف هذه المجموعة هو صنف القمح المعتمد *T.monococcum* ويندر زراعتها الآن إلا كغذاء للماشية حيث يُزرع على نطاق ضيق في جنوب ألمانيا وجنوب شرق أوروبا كغذاء للحيوانات (Feldman, 1976).

- مجموعة القمح ثنائي الحبة Emmer Group وهي أصناف رباعية المجموعة الصبغية (Tetraploids)، وقد نتجت عن التقاء النوع السابق (*T.monococcum*) مع الحشيشة البرية *Aegilops Speltoides* التي تحمل المورثة B فظهر صنف القمح الرباعي ذو المجموعة الصبغية (AABB) وتتميز أصناف القمح التابعة لهذه المجموعة باحتواء خلاياها على 28 صبغي (2n=28) وأنواعها البرية: *T. durum, T.dicoccum, T.dicoccoids* والصنف المعتمد المزروع *T. durum* وعنه نتجت بقية الأصناف، وهو يمتاز بمحتوى عالٍ من البروتين وأندوسبرم شفاف ولون أصفر غامق وهو ملائم لصناعة المعكرونة وقد انتشرت زراعته على مساحات واسعة، فيما اقتصر وجود النوعين الآخرين (*T.dicoccum, T.dicoccoids*) على الشكل البري (Feldman, 1976).

- مجموعة القمح العادي Common Wheat Group، وهي أصناف القمح سداسية المجموعة الصبغية (Hexaploids) ، نتيجة التهجين الاصطناعي ما بين صنفي القمح الرباعي *T.durum* وصنف القمح الثنائي البري *Ae.tauschi* الذي يحمل المورثة D تم الحصول على القمح السداسي *T.Aestivum* ذو المجموعة الصبغية من الشكل (AABBDD). عدد الصبغيات لخلايا أصناف هذه المجموعة 2n=42 وأهم أنواعها قمح الخبز *T. aestivum* و قمح *T. compactum* الذي يتمتع بمحتوى بروتيني منخفض ويلائم صناعة البسكويت (Zohary and Hopf, 1993)

تجدر الإشارة إلى أن كل مجموعة من المجموعات السابقة، تضم أصنافا" متشابهة مع بعضها البعض ليس فقط بعدد الصبغيات وإنما بعدد من الصفات الشكلية والاحتياجات البيئية.

٢-٢-٢ تصنيف يعتمد على مواعيد الزراعة:

- قمح شتوي: يزرع في الخريف في المناطق التي لا يكون شتائها باردا" لدرجة تجمد التربة، وتتم عملية الإنبات في الخريف ثم ينمو ببطء حتى يأتي الربيع فينمو بسرعة وينضج صيفاً.
- قمح ربيعي: يزرع في الربيع وأصناف هذا القمح سريعة النمو تُزرع في المناطق التي تتجمد فيها التربة شتاءً، وينضج بعد الصنف الأول بحوالي ثلاثة أسابيع.

٢-٢-٣ تصنيف يعتمد على تركيب الأندوسبرم :

- أصناف قمح شفافة: مكسرها زجاجي براق وغالباً ما تكون هذه الأقماح صلبة.
- أصناف قمح نشوية: مكسرها غير برّاق وتكون هذه الأقماح طرية.

وترجع صفة الشفافية أو النشوية في الحبوب بشكل أساسي إلى عوامل وراثية، فتكون أصناف القمح من النوع (*T.monococcum, T.durum*) شفافة المظهر، في حين تكون الأصناف من نوع (*T. aestivum, T.compactum*) نشوية. وتتأثر هذه الصفة أيضاً بالظروف الجوية فيمكن أن تتغير مع تغيير الظروف الزراعية، حيث تظهر صفة النشوية عند ظروف الأمطار الشديدة في حين يشجع الجو الحار على ظهور صفة الشفافية، فهي بالتالي لا تعتمد على الصنف فقط.

٢-٢-٤ تصنيف بحسب لون الحبة:

- القمح الأحمر: ويكون لون الحبة أحمر، أو أحمر غامق.
- القمح الأبيض: ويكون لون الحبة أبيض، أصفر فاتح، أو أصفر غامق.

٢-٢-٥ تصنيف يعتمد على صفات الحبة أثناء طحنها:

- قمح قاسي (Hard wheat): يعطي أثناء الطحن منتجات سهلة النخل، ويحتوي على حبيبات نشوية كاملة ذات شكل منتظم وهي عبارة عن خلايا الأندوسبرم، ويتم فصل الدقيق عن النخالة بسهولة.
- قمح طري (Soft wheat): يعطي أثناء الطحن منتجات ملتصقة صعبة النخل، ويكون الدقيق الناتج ناعم يحتوي على حبيبات نشوية غير كاملة ناتجة عن كسر خلايا الأندوسبرم، ويفقد كمية من الدقيق مع النخالة المفصولة حيث يبقى جزء من خلايا الأندوسبرم مرتبط مع خلايا الأليرون ولا يمكن فصله.

٢-٢-٦- تصنيف يعتمد على صفات الدقيق أثناء خبزه:

- أصناف قمح قوية الغلوتين (Strong): تعطي بعد الخبز صمون كبير الحجم، إسفنجي، ذو مواصفات حفظ جيدة، وتكون نسبة البروتين ونوعيته عالية في هذه الأصناف.
- أصناف قمح متوسطة القوة (Medium Strong): تكون نوعية البروتين جيدة، وتعطي أصناف هذه المجوعة منتجات خبزية بنوعية جيدة.
- أصناف قمح ضعيفة الغلوتين (Weak): تعطي رغيف صغير الحجم، غير مسامي، وتكون نسبة البروتين ونوعيته منخفضة في دقيق هذه الأصناف وهو غير صالح لصناعة الخبز ويستعمل في صناعة البسكويت والمعجنات.

ومن ذلك يتبيّن أن ارتفاع نسبة البروتين ليس العامل الذي يحدد قوة الدقيق، بل نوع البروتينات التخزينية التي تُشكَل الغلوتين.

٢-٢-٧ تصنيف القمح بحسب مناطق الإنتاج في العالم:

يُقسم القمح بحسب مناطق الإنتاج إلى:

أولاً: قمح أمريكا الشمالية :

أ- قمح كندا : تصنف بحسب مناطق الزراعة واللون والغرض من الزراعة والنوع إلى ١٩ مجموعة وذلك بحسب (Canadian Grain, 2009) نذكر منها:

- القمح الربيعي الغربي الأحمر(Canada Western Red Spring (CWRS
- القمح الديورم الغربي (Canada Western Amber Durum (CWAD
- قمح السهول الأبيض الربيعي (Canada Prairie Spring White (CPSW
- القمح الربيعي الشرقي الأحمر(Canada Eastern Red Spring (CERS
- قمح السهول الأبيض الربيعي (Canada Prairie Spring White (CPSW
- القمح الشرقي الأحمر (Canada Eastern Red (CER

ب- قمح الولايات المتحدة الأمريكية وتقسم إلى:

- القمح الربيعي القاسي الأحمر (Hard Red Spring Wheat (HRSW
- القمح الشتوي القاسي الأحمر (Hard Red Winter Wheat (HRWW
- القمح الشتوي الطري الأحمر (Soft Red Winter Wheat (SRWW
- القمح الأبيض White Wheat
- القمح الديورم Durum Wheat

ثانياً: قمح أمريكا الجنوبية :

تعتبر الأرجنتين أول دولة مصدرة للقمح في أمريكا الجنوبية وتنتج أصناف القمح القاسي، والطري، ونصف القاسي.

ثالثاً: القمح الأسترالي:

- القمح القاسي (Australian Hard)
- القمح القاسي الأولي (Australian Prime Hard)

- القمح الأبيض القياسي (Australian Standard White)
- القمح الطري (Australian Soft)
- قمح الديورم (Australian Durum)
- قمح الاستخدام العام (Australian General Purpose)
- قمح تغذية الماشية (Australian Feed)

رابعاً: القمح الأوروبي:

أصناف القمح في أوروبا هي من النوع الطري، ومتوسط القساوة، ماعدا روسيا حيث يتواجد فيها أيضاً نـوع القمح القاسي.

خامساً: القمح الأفريقي:

يزرع في مصر وتونس والجزائر وكينيا، وهو من النوع الديورم والطري(حسين، ٢٠٠٣)

سادساً: القمح الأسيوي:

تعد آسيا الصغرى المنشأ الأصلي للقمح وانتشرت الأنواع البرية (*Emmer, T.monococcum*) في جبـال سوريا وفلسطين منذ العصور القديمة، وتتركز زراعة القمح اليوم في الشـرقين الأدنـى والأوسـط والهنـد والباكستان والصين.

أما أصناف القمح المزروعة في سورية فهي من النوع الديوروم والطري، وتقسم إلى ثلاث مجموعات:

١. **أصناف القمح المحلية** : وهي أصناف القمح التي زُرعت في سوريا منذ مئات السـنين، ومـن هـذه الأصناف نذكر السلموني، البيرودي، الحوراني، الحماري، والشيحاني. وتعود هذه الأصناف لأحـد النـوعين الطري أو الديورم.

٢. **أصناف القمح المدخلة** : وهي أصناف القمح المستوردة من بعض البلدان ونجحـت زراعتهـا فـي سورية، ومن النوع الديورم نذكر سيناتوركابيلي، ومن النوع الطري تُزرع أصناف القمح المكسيكية (بيتـك، مكسيباك، سيته سيروس) وصنف القمح الفرنسي (فلورنس أورور).

٣. **أصناف القمح المطَورة والمنتجة محلياً** : وهي الأصناف التي تم انتاجها واختبارها من قبل مراكز الأبحاث الزراعية المنتشرة في سورية (ايكاردا، أكساد، الهيئة العامة للبحوث الزراعية ومراكزها المنتشرة في العديد من المحافظات).وهناك العديد من الأصناف نذكر من النوع الديورم وعلى سبيل المثال (شام١، شام٣، جزيرة١٧، أكساد٦٥، بحوث١،.....) ومن النوع الطري (شام٢، شام٤، شام١٠، بحوث٤، بحوث٦،..........)(كف الغزال وآخرون، ١٩٩٢).

٢-٣- أهم الطرق المستخدمة لتمييز أصناف القمح Wheat varietals identification methods:

يوجد العديد من الطرق لتحديد هوية أصناف القمح، منها الطرق التقليدية التي تعتمد على تحديد الصفات الشكلية لحبة القمح وللنبات أثناء نموه في الحقل، و الطرق الحديثة التي تقوم بتحديد الأنماط الوراثية للأصناف كطرائق التحليل النكليوتيدي، والطرائق المناعية، والرحلان الكهربائي والكروماتوغرافيا السائلة وغيرها من الطرق التي تستخدم منفصلة أو مجتمعة لتتمم إحداهما الأخرى، وفيما يلي نذكر بعض الطرق التي تعتمدها مراكز الأبحاث حاليا" للتمييز بين الأصناف.

٢-٣-١- التمييز البصري للخصائص المورفولوجية لنبات الحقل ولحبة القمح

(Visual identification of morphological characteristics):

يعتبر الوصف الدقيق للأصناف مطلب أساسي للحفاظ على نقاوة الأصناف النباتية المستنبطة، وتم الاعتماد على المواصفات الشكلية لحبة القمح ولنبات الحقل في تحديد هوية الأصناف منذ زمن بعيد (Sarkar and Stebbins, 1956)، لكن ومع تزايد أصناف القمح أصبحت مهمة تحديد نقاوة وهوية البذور من خلال المواصفات الشكلية عملية صعبة وشائكة، إلا أن نتائجها تبقى مُرضية للتجار والطحانون وذلك لتحديد سعر المادة ومعايرة المطحنة. ومن هذه الصفات التي يتم تحديدها بالنسبة لنبات الحقل نذكر:

١. شكل السنبلة : يتم الإشارة هنا إلى الشكل العام للسنبلة وموقع أعرض منطقة وتُصنف على أساسها إلى أصناف ذات سنابل مخروطية ومغزلية ومتوازية .

٢. طبيعة النمو: قائم ونصف قائم، نصف مفترش، مفترش، مفترش جداً.

٣. الشعيرات على العقدة الأخيرة للساق: قوية، متوسطة، ضعيفة، ضعيفة جداً.

٤. بالإضافة إلى صفات أخرى مثل كثافة السنبلة ، شكل كتف القنبعة وغيرها.

وأما المواصفات الشكلية لحبة القمح فيمكن أن نذكر منها:

١. شكل الحبة : مدور، بيضوي، متطاول، وذلك بحسب طول الحبة إلى عرضها .

٢. شكل منطقة الجنين : بيضوي ، مستدير، وبارز

٣. زاوية وجه الجنين مع الأفق : إذا كان أكبر من ٤٥° يوصف الصنف بأنه منحدر، أما إذا كان أقل من ٤٥° يوصف الصنف بأنه ضئيل الانحدار.

٤. لون الحبة : حبوب حمراء وأخرى بيضاء

٥. طول الشعيرات على رأس البذرة : قصيرة ، متوسطة ، طويلة، غائبة .

٦. قساوة أو هشاشة البذرة.

٧. وزن الألف حبة وهو تقريباً 30g (علاوي، ١٩٩٦)

٢-٣-٢ تقنية التحليل بالصور الرقمية (Digital Image Analysis (DIA:

منذ منتصف الثمانينات تم استخدام تقنية تحليل الصور لدراسة المواصفات المورفولوجية للحبوب بـدلا" عـن الفحص البصري التقليدي)، ولاقت هذه الطريقة فيما بعد قبولاً وانتشاراً في مجال تمييز أصناف الحبوب وفي دراسة تأثير بعض المتغيرات على مواصفاتها (Zayas et al., 1986; Braadbaart and Bergen, 2005) وكذلك في تحديد مجال الاستخدام الصناعي لها.

يعتمد مبدأ طريقة DIA على أخذ صور بسيطة أو ثلاثية الأبعـاد (Thomson and Pomeranz, 1991) لأصناف قمح مختلفة في الصفات الفيزيائية وتحليل هذه الصور ببرنامج خاص. يتم وفق هذه الطريقة تحديـد المواصـفات الفيزيائيـة التـي يمكـن أن تختلـف بـين الأصـناف كشـكل الحبـة وحجمهـا ولونهـا (Symons and Fulcher, 1988a,b; Majumard and Jayas, 2000a,b)

وعند الظروف الطبيعية للنمو يعتبر تحديد الميزات الفيزيائية كافٍ لتحديد هوية الأصناف، إلا أنه عند تعرض النبات إلى ظروف نمو سيئة غير طبيعية تقل كفاءة هذه الطريقة في تمييز الأصناف ويصبح تحديد هوية أصناف القمح غير دقيق نظراً لتأثر الصفات الفيزيائية بظروف النمو بشكل كبير (Halverson and Zeleny, 1988). كذلك يصعب على هذه الطريقة تحديد الملوثات الغريبة (من مصدر نباتي أو حيواني أو أتربة) التي يمكن أن تتواجد بين حبات القمح، حيث تختبئ ملوثات الحشرات بين حبوب القمح ولا يمكن تمييزها (Davies, 2000)، كما يمكن بسهولة تمييز حبوب الشيلم عن حبات القمح الأحمر الربيعي لكن من الصعوبة تمييزها بين حبوب الديورم (Majumard and Jayas, 2000a; Sapirstein and Kohler, 1995)

من ناحية أخرى، تتمَيز هذه الطريقة بأنها بسيطة وسهلة التطبيق، وتعطي نتائج دقيقة (عندما تكون ظروف النمو طبيعية) تخدم الدراسات الإحصائية للتعبير عن جودة العينة (Symons and Fulcher, 1988b) كما يمكن إعداد أرشيفا" مصورا" بالنتائج يُحدد فيه هوية كل صنف قمح بالاعتماد على بعض المواصفات الشكلية، ليكون ذلك الأرشيف المرجعي دليلاً يستخدم من قبل التاجر والخباز والطحان للتمييز بين الأصناف وتحديد مجال الاستخدام الصناعي الأمثل لها (Zayas *et al*., 1996).

٢-٣-٣- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

High performances liquid chromatography (HPLC)

يمكن أن تطبق هذه الطريقة على عينات القمح بمختلف أشكاله (حبوب قمح كاملة ، طحين، سميد، فرخة) وتعكس نتائج هذه التقنية الاختلاف في التركيب الوراثي من خلال فصل البروتينات التخزينية (الغليادين والغلوتينين). ولهذه التقنية عدة أنواع وفقا" لطريقة الفصل نذكر منها:

٢-٣-٣-١ الفصل بحسب الحجم

Size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC)

يتم فصل البروتينات بحسب حجمها وبشكل أدق بحسب متوسط قطر البروتين في المحلول (Stokes radius)، حيث يمر المحلول البروتيني خلال عمود الفصل الذي يحتوي على دعامة صلبة مكونة من كريات

مسامية، فالجزيئات الأكبر من مسام الكريات (البروتينات الضخمة) لا تكون قادرة علـــى الانتشـــار ضـــمن المسامات فتتحرك بسرعة ويحدث لها إزاحة من العمود أولاً. أما البروتينات الأقل حجما" فيتم إعاقتها نتيجـــة لانتشارها عبر المسامات، وبالتالي تحتاج إلى زمن تملّص أكبر (Bietz, 1984). يمكن من خلال هذه التقنية وبزمن يتراوح 20-30min، فصل بروتينات القمح إلى أربع مجموعات وهي وحـــدات الغلـــوتينين مرتفعـــة الوزن الجزيئي HMW ووحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي LMW ووحدات الغليادين والألبـــومين والغلوبولين (Autran, 1994). استخدمت هذه الطريقة حديثاً للتنبؤ بنوعية أصناف القمح وبدراسة الخـــواص التكنولوجية له (Gupta *et al*., 1993)، وأظهرت الدراسات بأن الظروف البيئية لنمو القمح ليس لها تـــأثير معنوي على نوعية البروتينات المفصولة وفق هذه التقنية (Scheromm *et al*. 1992).

٢-٣-٣-٢ الكروماتوغرافيا السائلة بالطور العكوس:

Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

يعتمد الفصل وفق هذه التقنية على (هيدروفوبية البروتينات) حيث تمتاز جزيئات الغلوتينين منخفضة الـــوزن الجزيئي LMW بخواص هيدروفوبية أعلى من هيدروفوبية وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW ولكنها تقترب من هيدروفوبية الغليادين (Gianibelli *et al*. 2001). أما بالنسبة لمجموعات الغليادين الأربع فإن الهيدروفوبية تزداد من ω ثم β إلى α وأخيراً γ- غليادين، ولهذا السبب فإن وحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي تتملص من عمود الفصل بعد وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي ولكنها تترافق بوحدات الغليادين نظرا" لخواصهما الهيدروفوبية المتقاربة (Bietz, 1990). بناء" على ذلك، فإن إحدى أهم الاعتبارات لهذه التقنية هو ضرورة تحضير العينات، حيث يفضّل فصل الغليادين عن الغلوتينين ويمكن ذلك بسهولة عـــن طريق استخلاص الغليادين بالكحول 70% (Butow *et al*., 2004).

تمتاز هذه الطريقة بسرعة إعطاء النتائج وحساسية عالية، وإمكانية الحصول على نتائج كميَـــة ممـــا يســـمح بدراسة التأثيرات البيئية والعوامل الوراثية علـــى نوعيـــة البـــروتين (Huebner and Bietz, 1988,and

(1994. من ناحية أخرى، فإن صغر حجم العينات المطلوب للتحليل يُمكَننا من تحديد نقاوة عينة القمح بإجراء التحاليل على عدد من الحبات المفردة (Marchylo and Kruger., 1988).

حظيت هذه الطريقة باهتمام بالغ من قبل الباحثين، وتمت دراسة العديد من العوامل التي تـؤثر علـى كفـاءة الفصل بـين البروتينـات المطلوبـة مثـل نـوع عمـود الفصـل وأبعـاده، نـوع المـذيبات وتركيزهـا (Huebner and Bietz, 1995). ويستخدم عادة أعمدة فصل مثل C_{18} أو C4 أو C8، والطور المتحرك هو الأسيتونتريل مع الماء وثلاثي فلور حمض الخل و عند طـول موجـة210nm (كاشـف UV).

(Naeem and Sapirstein, 2007; Qian *et al*., 2008; Dong *et al*, 2009)

تستخدم طريقة RP-HPLC على نطاق واسع في مجال تحديد خواص و هوية أنـواع وأصـناف الحبـوب (Wieser *et al*.1994). فقد بينت إحدى الدراسات علـى مجموعـة مـن الأصـناف مـن نـوع القمـح (*T.Aestivum*)، وجود وحدات بروتينية خاصة نوعية ومميزة لكـل صـنف مـن الأصـناف المدروسـة (Burke *et al*., 1991). وفي دراسة أخرى على عدة أنواع من القمح التي تختلف فيما بينها بدرجة القساوة وموسم الزراعة و اللون، تم التثبت من وجود قمتين في جميع أنواع القمح الطري المختبرة وهاتـان القمتـان غير موجودتين في أنواع القمح القاسي المدروسة وفُسر ذلك على أنه نتيجةً للاختلاف الجينـي بـين هـذين النوعين من القمح (Bietz *et al*., 1984 a,b).

كما أن فصل الغليادين والغلوتينين بواسطة RP-HPLC يسمح بالتنبؤ بـالخواص الخبيزيـة للقمـح (حجـم الرغيف، الزمن اللازم للعجن، قوة العجين، ...) من خلال القمم الممثلة للبروتينات المفصولة، ونسبة وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي إلى وحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي، وكذلك نسبة الغلوتينين إلى الغليادين (Rakszegi *et al*., 2005). غير أن بعض الأبحاث بينت أن كمية هذه المركبات المفصولة (القمم الظاهرة في كروماتوغرام الفصل) تتأثر بتغير الظروف البيئية لنمو النبات.

٢-٣-٤- اختبار الفينول Phenol test:

يعتمد اختبار الفينول على نشاط أنزيم بولي فينول أوكسيداز الذي يتواجد في القشرة الخارجية لبذور القمح، إذ تتوقف فعالية هذا الأنزيم على صنف القمح و شروط نموه، كما إن كميته في أنواع القمح الديورم هـي أقـل

مقارنة بالأنواع الأخرى من القمح (Lamkin et al., 1981). ويتم الاختبار بنقع حبوب القمح فـــي محلـــول الفينول، فتتم أكسدة هذا المحلول بواسطة أنزيم بولي فينول أوكسيداز، وينتج عن نشاط هذا الأنزيم لون بنـــي وصبغة غير ذائبة هي الميلانين. تتفاوت درجة تلون البذور من اللون العاجي إلى اللون البني الغامق، وذلـــك حسب التركيب الوراثي للبذور الذي يعكس نسب مختلفة من نشاط هذا الأنزيم، فالقمح الطري يحتـــوي علـــى كمية كبيرة نسبياً من إنزيم البولي فينول أوكسيداز فتتسرع تفاعلات الاسمرار وبالتالي تتلون حبـــوب القمـــح الطري باللون الأسود بينمـــا تحـــافظ حبـــوب القمـــح القاســـي إلـــى حـــد مـــا علـــى لونهـــا الكهرمـــاني (Fuerst *et al*., 2005; Vazquez, 2000).

يستخدم اختبار الفينول للتعرف على نقاوة الأصناف المختلفة والتمييز بينها، وتعتبر مـــن الطـــرق الواســـعة الانتشار في مختبرات فحص البذور وذلك لكونها طريقة سريعة، وغير مكلفة، وسهلة التطبيق على عدد كبير من الحبوب، وهذا يفيد في التقييم الإحصائي لتحديد مدى نقاوة العينة. إلا أن عجز هذه الطريقة يكمن في عدم إمكانية تطبيقها على عينات الطحين أو السميد. كما أن إمكانية التصنيف اعتماداً على هذه الطريقـــة محـــدودة حيث يتم توزيع أصناف القمح ضمن ثلاث أو أربع أنماط بحسب تلون القشرة الخارجية للحبة من عديم اللون إلى البني الغامق مروراً بالبني الفاتح والبني المتوسط.

٢-٣-٥- الطرائق المناعية Immunological analysis :

عُرف استخدام طرائق علم المناعة لدراسة ومقارنة بروتينات الحبوب قبل الطرق الكروماتوغرافيـــة وطـــرق الرحلان الكهربائي. يتم في هذه الطرق الكشف عن أجسام مضادة نوعية و ذلك بـــإجراء أحـــد الاختبـــارات المناعية المناسبة، التي تعتمد بشكل عام على ارتباط المستضد (Antigen) مع الجسم الضـــد (Antibody) المخصص له.

أجريت الدراسات الأولى منذ قرابة مئة عام على أصناف مختلفة من القمح لمعرفة مدى اســـتجابتها لمضـــاد مصل الأرنب antisera الذي يرتبط مع الغلوبولين المستخلص من هـــذه الأصـــناف (Zade, 1914)، وقـــد أظهرت الدراسات اللاحقة أنه يمكن تصنيف أصناف القمح بحسب استجابتها للمصل (serologically) حيث

أن الأصناف المتقاربة وراثيا" تبدي نفس الاستجابة (Skerritt, 1995)، كما تم العمل فيما بعد على تطوير الأجسام المضادة للبروتينات غير البرولامينية (غلوبولين، ألبومين).

أما حاليا"، فستخدم التحاليل المناعية للكشف عن الغلوتين في المنتجات الغذائية، كما تعتبر من التقنيات الهامة في التمييز بين الأصناف كما الكروماتوغرافيا والرحلان الكهربائي، إلا أنه من الصعب إتباعها لتحديد هوية صنف مجهول، وإنما تستخدم للتمييز بين مجموعة محدودة من الأصناف كالتمييز بين القمح الطري والقمح القاسي. في دراسة أجريت على 16 نوع من كل من القمح الطري والقمح القاسي، اختبرت إمكانية استخدام التحاليل المناعية لتحديد الألبومين الخاص بالقمح الطري، وقد تم التوصل من خلال النتائج إلى أنه يمكن باستخدام هذه الطريقة للكشف عن القمح الطري عند وجوده ضمن القمح القاسي بنسبة 10% (Piazzi and Cantagali, 1969). من ناحية أخرى، فقد استخدمت هذه الطريقة لتحديد مدى الغش في سميد القمح الديورم المستخدم لصناعة المعكرونة بقمح الخبز وقد بُنيت هذه التحاليل على تحديد antigen الموسوم من قبل المورثة D الموجودة في قمح الخبز (Pizzi *et al*., 1972).

من ناحية أخرى، فقد أوجد Jolly وآخرون عام 1993 مصل مضاد يرتبط مع بروتينات القمح الطري ولا يلاقي استجابة في بروتينات القمح القاسي، ولكنه وجد أيضاً أن بعض أنواع القمح القاسي قد تعطي استجابة مماثلة لأصناف القمح الطري وبالتالي فإن تمييز النوع قد يحمل أحيانا" بعض الشك.

٢-٣-٦- التحليل النكليوتيدي Nucleotide analysis:

يعتبر التحليل النكليوتيدي من أهم وأحدث الطرق المستخدمة لتحديد القرابة الوراثية ما بين الأنواع والأصناف والسلالات للكائنات الحية. وتعتمد على عزل الحمض النووي DNA أو RNA ، والتعرف على المادة الحية من خلال ترتيب النكليوتيدات الفريد في شريط DNA الخاص بها (Pavlova *at al*,2004)

وتعتبر تقنية التسلسلات البسيطة Simple Sequence Repeats (SSRs) الأكثر استخداماً لتمييز السلالات والأصناف القريبة نظراً لأنها تعمل على مواقع متعددة من سلسلة الـ DNA وتقوم هذه التقنية على ثلاث

مراحـــل، وهـــي عـــزل الـــــ DNA ، تضـــخيم DNA مـــن خـــلال التفاعـــل البـــولميري التسلســـلي (Polymerase Chain Reaction,) ومن ثم تجزئة نواتج التضخيم وفق تقنية الرحلان الكهربائي.

إن مقارنة العُصابات المفصولة للأصناف المدروسة مع بعضها ومع عينة قياسية، يمكَن من الحكم عل مـــدى قرابة الأصناف أو السلالات المدروسة من بعضها (Dograr and Mahinur,2001; Khan, 2003).

٢-٣-٧- الرحلان الكهربائي Electrophoresis:

سنفرد فصلا" خاصا" لهذه الطريقة كونها المستخدمة في هذا البحث.

٢-٤- الطرق المتبعة في سوريا لتمييز أصناف القمح Wheat identification in Syria:

يتم تمييز أصناف القمح المزروعة في سورية بالاعتماد على الطريقة التقليدية وذلك من خلال تحديـــد بعـــض المؤشرات والقرائن الشكلية لنبات القمح أثناء نموه في الحقل، وأهم الصفات الشكلية لحبة القمح. وقـــد قامـــت وحدة البذور في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ICARDA) بالتعاون مع المؤسســـة العامة لإكثار البذار، بإعداد كُتيب لتوصيف أصناف القمح المزروعة في سورية مورفولوجيـــاً (ICARDA, 1999). وقد توجهت هذه المراكز البحثية مؤخرا" بالبحث عن طرائق متطـــورة لتحليـــل وتوصـــيف القمـــح السوري بدقة.

٢-٥- الملامح النموذجية للطرق المستخدمة في تمييز أصناف القمح Ideal features for methods-of identification:

٢-٥-١- تأثير البيئة على المواصفات الوراثية The Impact of environmental on Genotype

يجب أن تعطي الطريقة المتبعة نتائج مستقلة عن تأثيرات البيئة وظروف نمو النبات. وهذا ما تحققه طريقـــة الرحلان الكهربائي عند تجزئة البروتينات التخزينية لأندوسبرم حبة القمح، وتكون النتائج ثابتة تجاه ظـــروف النمو غير الطبيعية التي قد يتعرض لها نبات القمح، كالصقيع في مرحلة النمو، أو الإنبـــات خـــلال مرحلـــة التخزين.على عكس المواصفات الشكلية للنبات التي تتأثر بشكل كبير بظروف النمو، وتحديد هويـــة الصـــنف اعتماداً على المواصفات الشكلية للحبة سيكون صعباً إلى درجة المستحيل إذا تعرض النبات لظروف نمو سيئة أو كانت هذه الحبوب منكمشة ومجعدة.(Wrigley and Batey, 1995)

٢-٥-٢- القدرة على تمييز الأنماط الوراثيـــة للأصـــناف Degree of Discrimination Between-Genotypes:

تحدد فائدة الطريقة من خلال قدرتها على التمييز الوراثي بين العديد من الأصناف ضمن النوع الواحد ويجب أن تكون العينة المختبرة نقية 100% لأن عدم تجانس العينة سيؤثر على النتائج بشكل كبير وهنـــاك بعـــض الطرق تحمل نتائجها مدلول وراثي مثل التحليل النكليوتيدي، وتجزئة البروتينات التخزينية بطريقتي الـــرحلان الكهربائي والكروماتوغرافيا السائلة. تقدم هذه الطرق التحليلية نتائج هامة توضح التنوع الـــوراثي للأصـــناف وهناك بعض الطرق لا تقدم تمييز كاف للأصناف بل تقتصر على تحديد النوع فقط وذلك كما في نتائج اختبار الفينول فيمكن أن تحدد نمطين أو ثلاث أنماط وراثية لأنواع القمح.

٢-٥-٣- سرعة التحليل Speed of Analysis:

في كثير من الأحيان أثناء تحديد هوية الأصناف، يُطلب أن يكون القرار سريع وحاسم وذلك في حالات استلام الحبوب في المطحنة أو الصوامع وفي مثل هذه الحالة تُفضّل طرق التمييز البصـــري (أي التمييـــز بحســـب المواصفات الشكلية) أو التمييز بالصور DIA، وأيضـــاً طرائـــق علـــم المناعـــة (Edward, 1994) إذ أن الاختبارات الموضوعية للتحديد الدقيق لصنف القمح تتطلب وقت أطول وأجهزة خاصة. ولتجنـــب الاســـتلام الفوري يمكن أن ترسل العينة للفحص وتحدد هويتها قبل موعد الاستلام على أن يتم أيضاً تحليلها بعد الاستلام ومطابقة النتائج بوقت لاحق (Edward, 1994).

٢-٥-٤ موضوعية الاختبار Objectivity of Testing:

يجب أن تكون النتائج موضوعية تعبّر عن العينة بدقة ولا تتأثر بالطبيعة الشخصية للمحلل ويحدث الكثير من الخطأ أثناء التقييم البصري إذ يتأثر هذا التقييم بحواس وخبرة المحلل، بينما تكون النتائج حاسمة وموضـــوعية ويكون الخطأ التجريبي في أدنى مستوى عند استخدام طرائق مثل التحليل النكليوتيدي، الـــرحلان الكهربـــائي والكروماتوغرافيا السائلة.

٢-٥-٥ أهمية النتائج في تحديد النوعية significance of test results to utilization quality:

يجب أن تحمل نتائج التحليل مدلول كمي وذلك لما لهذه النتائج من تأثير على العمليات التصـــنيعية للحبــوب. فمثلاً يؤثر لون الحبة ومحتوى الرطوبة على عملية طحن الحبوب وضبط شروط المطحنــة، وعلـــى عمليـــة تصنيع المعكرونة، وكذلك يؤثر محتوى الأندوسيرم من البروتينات التخزينية التـــي تشـــكل الغلــوتين علـــى الخواص الريولوجية للعجين، كما وتتأثر نوعية المنتجات الخبزية بوجود وغياب بعض الوحـــدات البروتينيـــة الناتجة عن تجزئة الغليادين والغلوتينين وفق تقنية الرحلان الكهربائي(MacRitchie, 1984)

٢-٥-٦ المدلول الإحصائي للنتائج Methods Providing Statistically Significant Results

تعتبر الطريقة المتبعة في تحدد هوية الأصناف لعدد كبير من البذور هي الأفضل لأنهـــا تفيـــد فـــي التقيـــيم الإحصائي فمثلاً طريقة اختبار الفينول وتحديد لون النخالة تُجرى ببساطة على عدد كبير من الحبـــوب وهـــذا يعتبر مفيد لتحديد نسبة نقاوة العينة. غير أنه عند اختيارنا لطريقة الرحلان الكهربـــائي أو الكروماتوغرافيـــا السائلة لابد من إجراء الاختبار على عدد من حبات القمح المفردة ودراسة المدلول الإحصائي لاعتماد نتـــائج هذا الاختبار في تحديد هوية الأصناف.

٢-٦- مبدأ اختيار طريقة التحليل أو التصنيف (Criteria to Choice The Analysis methods)

يتضح مما شرحناه سابقا" بأن كل طريقة من الطرق المعتمدة لتحليل وتصنيف القمح تعطي معلومات محـــددة بالنسبة لكل صنف، إلا أن اختيار الطريقة يحدد بحسب الهدف :

- التأكد من هوية صنفٍ ما: وهنا يتم تحليل العينة ومقارنتها بالبيانات المرجعية لعينة قياسية من نفـــس الصنف، وفي هذه الحالة يمكن إن تفي إحدى الطرق التالية بالمطلوب: الـــرحلان الكهربـــائي أوالتحليـــل النيكليوتيدي أو التحاليل المناعية أوHPLC.
- التمييز بين صنفين: وهنا يتم اختيار طريقة تُبرز ميزات كل صنف وفي هذه الحالة يمكـــن اختيـــار إحدى الطرق المذكورة سابقا" وخاصة الرحلان الكهربائي وHPLC.

- تحديد نوع صنف مجهول: وهي من أصعب المهام لأنها تتطلب إجراء مجموعة من الاختبارات وبطرق عديدة ليتم التأكد من هوية الصنف.
- مدى تجانس العينة:من حيث احتوائها على عدة أصناف من القمح أو اختلاط عينة القمح بأنواع أخرى من الحبوب ويفضل هنا اختبار الفينول.

إن الطريقة الأمثل للتصنيف هي الطريقة التي تسمح بأرشفة النتائج وإعداد قاعدة بيانات مرجعية لعينات قياسية كما هو الحال بطرق التحليل الحديثة: الرحلان الكهربائي، HPLC، التحليل النيكليوتيدي، نذكر مثالا" على ذلك برنامج WhatWheat والذي يضم قاعدة بيانات خاصة بتصنيف وطرق تحليل القمح الاسترالي فهي بذلك تمكن من التوصيف والتصنيف السريع للقمح الاسترالي(Bekes *et al*., 1991).

تجدر الإشارة إلى أنه لا توجد طريقة تصلح لتكون طريقة مرجعية لتحديد هوية صنفٍ ما مجهول والطرائق المذكورة سابقا" تكمل بعضها بعضاً.

الفصل الثالث

تصنيف القمح بتقنية الرِحلان الكهربائي

Wheat varietal identification by electrophoresis

٣-١- مقدمة:

تطبق تقنية الرحلان الكهربائي في العديد من مخابر الأبحاث الدولية (ICC, ISO, ISTA) وقد استخدمت منذ عشرات السنين في كل من كندا وأمريكا وأستراليا والعديد من الدول الأوروبية، وحديثاً في الأرجنتين والبرتغال ومصر وإيران وتركيا لتحديد هوية الأصناف المزروعة في تلك البلدان. تفيد هذه التقنية بمراقبة نقاوة الأصناف وتعتبر نتائجها بيانات قيّمة تستخدم في برامج تربية القمح لتطوير الأصناف واستنباط سلالات جديدة بنوعية بروتين ممتازة وملائمة للصناعات المتعددة إذ أن جودة المنتجات مرتبط بوجود وحدات بروتينية محددة.

٣-٢- تعريف الرحلان الكهربائي Electrophoresis

يعتمد مبدأ الرحلان أو الفصل الكهربائي على تحرك الجزيئات المشحونة تحت تأثير مجال كهربائي نحو القطب المخالف لها بالشحنة. فإذا وضع مزيج من الأيونات في وسط ملائم وطُبق على هذا الوسط فرق كمون كهربائي، انفصلت الشوارد، واتجهت الأنيونات نحو القطب الموجب والكاتيونات إلى القطب السالب (العودة و سمينة ، ١٩٩٨). تعتمد درجة الفصل (أو سرعة الهجرة) على عدة عوامل أهمها:

١- الشحنة الصافية الكلية للجزيء (مقدار الشحنة على وحدة الكتلة لكل شاردة) وهذا يتعلق أيضا" بدرجة pH الوسط وقوته الأيونية.

٢- حجم وشكل الجزيء.

٣- قوة الحقل الكهربائي أو الكمون المطبق.

٤- طبيعة وسط الدعامة.

٥- الحرارة المتولدة أثناء الهجرة الكهربائية

تطبق تقنية الرحلان الكهربائي على نطاق واسع لفصل الجسيمات الغروية المشحونة مثل البروتينات والسكريات المتعددة، كما تعتبر طريقة موثوقة ومعتمدة من أجل التحديد الكيفي والكمي لمزيج معقد من البروتينات، حيث يُمكن بالاعتماد على هذه التقنية تحديد الأوزان الجزيئية التقريبية للبروتينات، بالإضافة لتحديد مدى نقاوة البروتينات (وخاصة الأنزيمات).

٣-٣-أنواع أنظمة الرحلان الكهربائي:

وهناك نوعين لأنظمة الرحلان الكهربائي:

الأول: الأنظمة الأساسية المحافظة على البروتين (Native or non denaturing System).

الثاني: الأنظمة المخربة للبروتين (Denaturing System) ومن أشهرها SDS-PAGE وهو اختصار لـ Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis أي الرحلان الكهربائي باستخدام هلام متعدد الأكريل أميد بوجود كبريتات دوديسيل الصوديوم.

وللرحلان الكهربائي أنواع عديدة بحسب آلية فصل البروتينات منها الرحلان الكهربائي الشعري (بطريقة الأنابيب الشعرية Capillary electrophoresis)، التعادل الكهربائي البؤري (isoelectric focusing)، والرحلان الكهربائي النطاقي zone electrophoresis.

٣-٤- أجزاء نظام الرحلان الكهربائي:

- الوسط الدعامي Supporting Medium
- المحاليل المنظمة Buffer Solutions
- مزود التيار الكهربائي power supply
- جهاز الهجرة الكهربية Electrophoresis Apparatus يختلف باختلاف نوع الرحلان الكهربائي المطبق.

أولا": الوسط الدعامي Supporting Medium: وهو الوسط الذي تتم عليه عملية الهجرة الكهربائية وله عدة أنواع:

١- الورق: يعتبر الورق رخيص الثمن وسهل الاستعمال، وهو أول ما استخدم لغرض الفصل بالهجرة الكهربائية. إلا أن أهم سلبياته حدوث خلط بين المناطق المفصولة، وهذا راجع لادمصاص الجزيئات على السيليلوز ويحتاج وقت أطول للفصل (حوالي16-14 ساعة).

٢- الآغار الهلامي (Agar gel): من مميزاته أنه متعادل كهربائيا"، و له مقدرة عالية على فصل البروتينات كما أن طبيعته الشفافة تسمح بإجراء عمليات المسح الضوئي وخاصة باستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية (Densitometer) بهدف التقدير الكمي للمكونات المفصولة.

٣-خلات السيليلوز Cellulose Acetate: وتنتج عن معاملة مجاميع الهيدروكسيل المتواجدة على سطح السيليلوز بحمض الخل اللامائي، وتكون خلات السيليلوز عبارة عن أغشية متشابكة تحتوي على فراغات هوائية (بنسبة%80)، وعندما تبلل بالمحلول الموقي فإن السائل يحل محل الهواء ويصبح الغلاف مرنا" تماما"، ومن مميزات استخدامه هو قصر مدة الفصل إذ تستغرق من 60-20 دقيقة.

٤- النشاء المجلتن: هو من أقدم الأوساط الدعامية المستخدمة في أجهزة الرحلان الكهربائي ويحضَر بمزج النشاء مع المحلول الموقي، ثم يسخن فوق درجة حرارة الجلتنة للنشاء ثم يسكب في قالب مناسب. استخدمت هذه الطريقة لفصل غليادين القمح وكان المحلول الموقي المستخدم هو لاكتات الألمنيوم عند pH= 3.1 (Woychik *et al*, 1961;Jones *et al*.,1959) ، واعتمدت هذه الطريقة فيما بعد من قبل الجمعية الدولية لعلوم وتكنولوجيا الحبوب تحت رقم (ICC 142). وقد تم حديثاً الاستغناء عن هذا الهلام واستبدل بهلام بولي أكريل أميد.

٥- هلام (جل) متعدد الأكريل أميد (Polyacrylamide): وهو الوسط الدعامي المستخدم في طريقتي الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE, A-PAGE). يتم تشكيل هذا الهلام بمزج الأكريل أميد (مونومير) مع جزيئات *N,N'*- methylene bisacrylamide (الذي يلعب دور مادة رابطة مستعرضة Cross linking)

لتتم البلمرة في وسط قلوي بوجود فوق كبريتات الأمونيوم و تترا متيل ايتيلين دي أمين (TEMED). تشــكل فوق كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2S_2O_8$ مصدرا" للجذور الحرة حيث تتفكك شــاردة $S_2O_8^{2-}$ إلــى جــذرين (SO_4^{-}) ، أما مركب TEMED فيسرع تحول جزيئات فوق كبريتات الأمونيوم إلى جذور الكبريتات الحــرة ويتفاعل أيضا" مع الجذور المتشكلة مما يعطي جذور أخرى أكثر نشاطا". نتيجة للبلمرة، تتشكل سلاسل طويلة ترتبط مع بعضها مؤلفة شبكة من الألياف الصلبة المغمورة في المحلول الموقي الذي يحافظ على البنية ثلاثية الأبعاد للهلام وبدونه يجف الهلام متحولا" لفيلم رقيق.

$H_2C=CH-C(=O)-NH_2$ + $H_2C=CH-C(=O)-NH-CH_2-NH-C(=O)-CH=CH_2$ $\xrightarrow{\text{catalyst}}$ polyacrylamide

Acrylamide Bisacrylamide

الشكل (٣): آلية تشكيل بوليمير الأكريل أميد(Mikkelsen and Cortón, 2004)

يتم التعبير عن تركيز هلام الأكريل أميد بواسطة قيمتين T% وهي تركيز الأكريل أميد وC% وهي تركيــز بيس أكريل أميد وتحسب هذه القيم على النحو التالي:

T% = (وزن الأكريل أميد (g) + وزن بيس أكريل أميد (g))/ حجم المحلول (100 ml)

C% = وزن بيس أكريل أميد (g) x /100 (وزن الأكريل أميد (g) + وزن بيس أكريل أميد (g))

بزيادة T% عند C% ثابتة فإن عدد السلاسل يزداد بينما يتناقص حجم المسامات، ويستخدم هذا الهلام لفصل البروتينات الصغيرة. وبالعكس بزيادة C% عند T% ثابتة فإن عدد السلاسل يتناقص ويزداد حجم المســامات وهذا يستخدم من أجل فصل البروتينات الكبيرة.

من أهم إيجابيات هلام الأكريل أميد أنه شفاف، وهذا يسمح باستخدام جهاز Densitometer لقيــاس كثافــة المكونات المفصولة على الهلام، كما أنه لا يرتبط بالصبغة الملونةِ للبروتين، ومقاومته الكهربائية منخفضــة، بالإضافة لكونه ثابت حراريا" وله قوة تماسك جيدة وخامل كيميائيا" و لا يحمل شحنة كهربائيــة. مــن جهــة

أخرى، يمكن التحكم في حجم مسام هذا النوع من الهلام، بحيث يكون حجم المسام مناسباً لفصل البروتينــات المدروسة ويم ذلك من خلال ضبط شروط عملية البلمرة وتغيير تركيز الأكريل أميــد(القليــوبي وزملائــه، ١٩٩٧).

ثانيا" : المحلول المنظم Buffer Solutions:

يتم انتقال التيار الكهربائي في خلية الرحلان الكهربائي بواسطة أيونات المحلــول المــوقي بشــكل أساســي، وللمحلول الموقي دور في المحافظة على درجة الحموضة المطلوبة، وتبديد الحرارة المتشكلة أثناء الــرحلان، ويؤمن الوسط الذي يحافظ على نشاط البروتين في الأنظمة التــي لا يتخــرب البــروتين خلالهــا (Native electrophoresis) ، ويتم اختياره بحيث لا تتفاعل أيوناته مع المادة المراد فصلها.

ثالثا": الحقل الكهربائي Electrical Field :

التيار الكهربائي المستمر هو المستخدم بحيث يمكن اختيار النظام ذو الشدة الثابتة أو الفولط الثابت أو الطاقــة الثابتة. تتراوح قوة الحقل الكهربائي من(2-8 V/cm) أو شدة التيار الكهربائي بــين (15- 25 mA /mm) فإذا زادت قوة الحقل عن (10V/cm) فانه بفعل جول يتحول جزء من الطاقة الكهربائية إلى حــرارة ممــا يسبب تشوه العصابات المتشكلة. لذا تعتبر طرق التبريد مفيدة جدا" لأنها تمكن من استخدام حقل كهربائي بقوة (100V/cm) مع اتخاذ إجراءات الأمان المطلوبة لاستخدام الفولط العالي وهذا يفيد في زيادة سرعة الفصل.

٣-٤-أهمية دراسة غلوتين القمح باستخدام تقنية الــرحلان الكهربــائي Wheat Gluten Study by Electrophoresis

إن اختلاف البروتينات بالتركيب والشحنة والشكل والحجم يؤدي لاختلاف حركتها ضمن المجال الكهربائي مما يسمح بفصلها بسهولة باستخدام تقنية الرحلان الكهربائي.

تُجرى عادة تجزئة بروتينات القمح وفق تقنية الرحلان الكهربائي لهدفين أساسيين:

١- تحديد هوية أصناف القمح والتمييز فيما بينها.

٢- التنبؤ بالخواص التكنولوجية والخبيزية للقمح.

٣-٤-١ تحديد هوية أصناف القمح والتمييز فيما بينها Wheat Varietals Identification:

إن التركيب الأساسي الناتج عن فصل بروتينات الغلوتين (الغليادين والغلوتينين) بتقنية الرحلان الكهربائي يتبع مباشرة التركيب الجيني للقمح (بصمة الأصابع) ولا يرتبط بشروط النمو، كمية البروتين، الانتاش والمعالجات الحرارية (Wrigley *et al*., 1982)، ولهذا فقد استخدمت هذه البروتينات كمؤشرات جينية حساسة لتحديد الاختلاف الجيني للقمح (Payne, 1987).

تبين عند تجزئة غلوتين العديد من أصناف القمح وجود وغياب بعض الوحدات واختلاف في كثافة وترتيب هذه الوحدات وبالتالي فإن الاعتماد على تركيب هذه الوحدات يعتبر مفيداً للتمييز بين الأنماط الوراثية للأصناف (Shahnejat *et al*; Sara, 2006).

أجريت العديد من الدراسات في مختلف بلدان العالم للاستفادة من نتائج فصل الغليادين بالرحلان الكهربائي للتمييز بين الأصناف وتحديد هويتها، ففي دراسة أجريت على 88 صنف من أصناف القمح الكندي بنوعيه القاسي والطري أكد Zillman وBushuk (1979a) بأن وحدات الغليادين المفصولة وفق تقنية الرحلان الكهربائي لا تتعلق بظروف النمو وهذا ما تم تأكيده في العديد من الدراسات (Robert and Clement., 1987; Lookhart and Finney ., 1984). من ناحية أخرى، فقد أظهرت الدراسات أن زيادة محتوى البروتين لصنف قمح محدد تعطي زيادة معنوية بنسبة الغليادين وكذلك بنسبة الغلوتينين، إلا أنها لا تؤثر على نوعية هذه البروتينات، فتبدو الوحدات البروتينية المفصولة وفق تقنية الرحلان الكهربائي، متماثلة ومتطابقة لجميع عينات القمح في مجال اختلاف لمحتوى البروتين يصل إلى حوالي 7% (Fullington e*t al*,1983).
كما تبين ثبات نوعية بروتينات القمح التخزينية مع اختلاف مستوى تسميد الأرض، ويكون التأثير في نسبة البروتين لصنف القمح وليس بنوعيته (Zillman and Bushuk,1979b) بالإضافة لذلك فإن ظروف النمو غير الطبيعية التي قد يتعرض لها نبات القمح، كالصقيع في مرحلة النمو، أو الإنبات خلال مرحلة التخزين، ليس لها أي تأثيراً على نوعية غليادين القمح، فتبدو مخططات فصل الغليادين وفق تقنية الرحلان الكهربائي لأصناف القمح المصابة بالصقيع مطابقة لمقابلاتها في الحبوب السليمة، هذا على عكس الخواص الفيزيائية

والوظيفية التي تتأثر بشكل كبير عند تعرض الحبــوب للإنبــات أو الإصــابة بالصــقيع (Lookhart and Finney, 1984).

أما فيما يتعلق بحبوب القمح المصاب بالصدأ، فقد أظهرت الدراسات تناقص بحجم البروتين المترسب، وارتفاع بنسبة الحموض الأمينية القاعدية، وانخفاض بنسبة حمض الغلوتاميك وحمض البرولين، بينما تبقى مخططــات فصل الغليادين مطابقة لمثيلاتها في الحبوب السليمة (Wrigley and Bushuk, 1971). علاوة على ذلــك، فقد بينت نتائج الميكسوغراف تأثير أشعة غاما على الخواص الريولوجية للعجين، في حين لم تحــدث تغييــر معنوي على نوعية البروتينات التخزينية (Koksel *et al*.,1998).

تبين من خلال دراسات سابقة أن منطقة γ –غليادين لأصناف القمح الديورم تحتوي علــى العصــابة γ–45 المميَزة لهذه الأقماح، في حين يُلاحظ وجود عُصابة γ–42 في منطقة الفصل ذاتها، لأصناف القمح الطــري (D'Ovidio and Masci, 2004; Edurne *et al*, 2006).

أكدت أيضا" العديد من الدراسات على أهمية وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW فــي مجــال تحديد هوية أصناف القمح بشكل عام والأقماح السداسية منها على الخصوص (Tahir, 2008;Gianbelli *et al*.,2001)، إذ أن تحت الوحدات البروتينية HMW تتباين من حيث العدد والترتيب على جل الفصــل بــين الأصناف المختلفة. من جهةٍ أخرى، فقد أكدت دراسات عديدة أن دراسة الغلوتينين بتقنية الرحلان الكهربــائي يعطي نتائج أكثر دقة في مجال تصنيف القمح مقارنة بنتائج تجزئة الغليادين، وهــذا يعــود لكــون وحــدات الغلوتينين المفصولة HMW تعطي عصابات متباعدة يمكن تحديدها بدقة وتحليلها إحصائيا". وبالرغم من أن وحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي تشكل 60% من بروتينات الغلوتين، فإنها لا تعتبر مفيدة في مجال التمييز بين الأصناف وذلك نظراً لصعوبة فصلها وفق تقنية الرحلان الكهربائي أحادي البعد (Sara, 2006; Dunbar *et al*,1985).

وفي هذا السياق، بينت دراسات سابقة أن الرحلان الكهربائي من الطرق الدقيقة والموثوقة في الكشــف عــن القمح الطري في السميد أو المعكرونة عند وجوده بتراكيز منخفضة (عليا، ٢٠٠٠).

٣-٤-٢ التنبؤ بالخواص التكنولوجية والخبيزية لطحين القمح Prediction of flour processing and baking quality:

يوجد ارتباط وثيق بين كمية ونوعية تحت الوحدات البروتينية (الناتجة عن فصل بروتينات الغلوتين بالرحلان الكهربائي) وبين الخواص التكنولوجية للقمح والمنتجات النهائية (Wrigley *et al*.; 1998; Gianibelli *et al*., 2001)، حيث تتميز هذه البروتينات عن البروتينات الأخرى (الألبومينات والغلوبولينات) التي لا يختلف تركيبها بين الأصناف ولا تؤثر على الخواص الخبيزية للقمح (Eliasson and Larsson, 1993; Duponta and Altenbach, 2003). يؤثر الغلوتين على الخواص الخبيزية للقمح من خلال:

- ✓ الوزن الجزيئي لتحت الوحدات البروتينة المفصولة.
- ✓ نسبة LMW إلى HMW (تنخفض جودة القمح الخبيزية بارتفاع هذه النسبة).
- ✓ نسبة الغليادين إلى الغلوتينين (تنخفض جودة القمح الخبيزية بارتفاع هذه النسبة).
- ✓ وجود بعض العصابات المميزة بالنسبة للغلوتينين مرتفع الوزن الجزيئي.
- ✓ وجود العصابات المميزة γ-غليادين.

تعتبر وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئيHMW مفيدة للتنبؤ بنوعية الغلوتين، وقد أجريت العديد مـــن الدراسات لتحديد نوعية الغلوتين وفقا" لوحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي التي يعبر وجود بعضها عن نوعيـــة المنتجـــات الخبزيـــة (MacRitchie., 1984; Masouleh, 2005; Shahnejat *et al*, 2006) (الجدول ٥).

الجدول (٥) تحديد خواص القمح الخبيزية من خلال وحدات HMW (Masouleh, 2005)

خواص الجودة	أرقام تحت الوحدات البروتينية مع الكروموزوم		
	1A	1B	1D
ممتاز	-----	-----	5+10
عالية	1 Or 2	17+18 7+8	-----
متوسط	---	7+9	3+12، 2+12
ضعيف	Null	7 Or 6+8	4+12

أكد أيضا" Lafiandra وآخرون (1993) أن العصابات الأهم من HMW للغلوتينين هي Glu 5+10 التـــي تتواجد في القمح ذو المواصفات الخبيزية الجيدة بينما العصابات Glu 2+12 تتواجد في القمح ذو المواصفات الخبيزية المتدنية. أما العصـــابات GluB1 17+18 فتـــرتبط مباشـــرة مـــع مواصـــفات العجـــين القويـــة (Gupta *et al*., 1992).

وتوصلت إحدى الدراسات إلى أن صنف القمح المناسب لصناعة النودلز هو الذي يحمل وحـــدات الغلـــوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي 1، 5، 17، 18، 10 حيث تكون قوة العجين الناتج ممتازة وملائمة لتشكيل النـــودلز، والصنف الذي يحمل الوحدات 2، 5، 10 يعطي عجين لزوجته جيدة، أما القمح الذي يضم الوحدات البروتينية 2، 12 فيعتبر قمح فقير ويعطي نودلز بنوعية متدنية (Meng and Gai, 2008)

٣-٥- طرق دراسة غلوتين القمح باستخدام تقنية الرحلان الكهربائي

يمكن فصل البروتينات التخزينية (الغليادين والغلوتينين) في الحبوب وفق تقنية الرحلان الكهربائي بعدة طرق من أهمها:

٣-٥-١ الفصل بالاعتماد على نقاط التعادل الكهربائي البؤري Isoelectric Focusing:

يتم فصل البروتينات على جل يحمل تدرجاً لقيم الـ pH حيث تخضع البروتينات أثناء الهجرة إلى قوة دفع تتناسب طرداً مع شدة تيار الحقل ومقدار الشحنة الذي يزداد كلما ازداد الفرق بين قيمة pH الوسط ونقطة التعادل الكهربائي للبروتين. تتحرك البروتينات عبر الجل وصولاً للنقطة المقابلة لنقاط التعادل الكهربائي (isoelectric point)، فتصبح عند هذه النقطة عديمة الشحنة ويتوقف البروتين عن الحركة (Wrigley and Bietz,1988) . من مساوئ هذه الطريقة أنها مكلفة وصعبة التطبيق وهي لا تستخدم إلا عند عجز الطرق الأخرى عن فصل بعض أنواع البروتينات كما في بروتينات الذرة.

٣-٥-٢ الفصل باستخدام جل بولي أكريل أميد حمضي (A-PAGE):

حيث يستخدم محلول موقي حمضي من لاكتات الصوديوم أو لاكتات الألمنيوم (pH=3.1) وذلك لتأيين البروتينات والمحافظة عليها بشكل منحل، ويتم فصل البروتينات بالاعتماد على حجمها وشحنتها. وتستخدم هذه الطريقة في تحديد هوية أنواع القمح بالاعتماد بشكل أساسي على نتائج تجزئة الغليادين وهي الطريقة المتبعة من قبل الجمعية الدولية لعلوم وتكنولوجيا الحبوب تحت رقم ICC143 لعام 1994 وهذا يتوافق أيضاً مع الطريقة المتبعة من قبل هيئة المواصفات العالمية ISO1990 كما وتعد الطريقة المرجعية القياسية للجمعية الدولية لاختبار البذور ISTA (Cooke, 1992).

اعتمادا" على طريقة Al-lactate PAGE (أي الرحلان الكهربائي على جل بولي أكريل أميد باستخدام لاكتات الألمنيوم كمحلول موقي)، تم تحليل غليادين 88 صنف من أصناف من القمح الأمريكي القاسي والطري، وقد بينت نتيجة الدراسة وجود شريط واحد أو أكثر تتميز بحركتها البطيئة في جميع أنواع القمح الطري، وحركة هذه الشرائط أبطأ من أبطأ شريط من الشرائط التي يحويها القمح القاسي، ولهذا اعتبرت هذه الشرائط البطيئة

مميزة للقمح الطري عن القمح القاسي. إلا أن بعض الأصناف المتقاربة وراثياً أعطت مخططات فصل متماثلة وكان من الصعب التمييز فيما بينها (Jones *et al*., 1979). أدخل Lookhart وآخرون 1982 بعض التعديلات على الطريقة السابقة بهدف تحسين كفاءة فصل وحدات الغليادين، حيث تم تعديل تركيز جل الفصل واستخدم لاكتات الصوديوم كمحلول موقي، وتم الاعتماد على هذه الطريقة المعدّلة في تمييز 232 صنف من أصناف القمح الإيطالي و تقسيمها إلى 50 مجموعة بالاعتماد على نتائج الفصل (Pogna *et al*., 1982) أجريت دراسة للفصل بين القمح الطري، القمح القاسي، الجاودار والتريتيكالي باستخدام تقنية Al-lactate PAGE، أكدت نتائج الدراسة وجود شرائط من ω–غليادين في القمح الطري دون القمح القاسي. كما أن الشرائط الموجودة في المناطق α، β و γ–غليادين كانت مختلفة في هذين النوعين وهذا يعود إلى الاختلاف الجيني بين هذين النوعين من القمح (Cooke, 1988).

٣-٥-٣ الفصل باستخدام جل بولي أكريل أميد بوجود دودسيل سلفات الصوديوم

Separation of Wheat Protein By Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide Gel Electrophoresis

أثبت Leammli 1970 بأن تجزئة البروتينات على جل بولي أكريل أميد بوجود دودسيل سلفات الصوديوم يرفع كفاءة الفصل ويعطي معلومات عن تركيب البروتين ويحدد الأوزان الجزيئية للوحدات البروتينية المفصولة.

أما بالنسبة للغلوتينين فقد أدرك المستخدمون الأوائل لنظام الرحلان الكهربائي Sise exclusion GE بأنه لا يمكن أن يحلل وفق هذه التقنية بسبب ضخامته (Woychik *et al*,1961)، وقد تمكن العالم ذاته من فصل الغلوتينين إلى مجموعة من تحت الوحدات البروتينية وفق تلك التقنية بعد استخدام β-Mercaptoethanol كعامل مرجع للغلوتينين ولكنَ شكل العصابات لم يكن واضحاً كفاية(Woychik *et al*,1964) ، وحلت هذه المشكلة فيما بعد من قبل (Bietz and Wall, 1972; Hamauza *et al*,1972) وذلك من خلال اعتماد طريقة الرحلان الكهربائي SDS-PAGE .

الفصل الرابع

القسم العملي

خطة البحث:

١. اختيار أصناف القمح

٢. تحضير المستخلصات البروتينية (الغليادين والغلوتينين)

٣. تحضير هلام الرحلان الكهربائي SDS-PAGE

٤. تجزئة الغليادين والغلوتينين بالرحلان الكهربائي

٥. تقييم الوزن الجزيئي لوحدات الغليادين والغلوتينين المفصولة بالرحلان الكهربائي

٦. معالجة النتائج بواسطة برنامج Scion-Image

٧. تقدير مدى الارتباط والتشابه الوراثي بين الأصناف باستخدام برنامج Minitab

٨. التحليل الإحصائي للنتائج ببرنامج SPSS 14

٩. دراسة تأثير تغير الموقع الجغرافي على نتائج تجزئة الغليادين والغلوتينين بالرحلان الكهربائي

١٠. دراسة تأثير سنة النمو على نتائج تجزئة الغليادين والغلوتينين بالرحلان الكهربائي

١١. تمييز أصناف القمح المدروسة اعتماداً على نتائج تجزئة الغليادين والغلوتينين بالرحلان الكهربائي

١٢. تحديد هوية أصناف القمح من خلال مخططات تجزئة الغليادين والغلوتينين بالرحلان الكهربائي

١٣. تقدير نوعية الغلوتين للقمح بالاعتماد على نتائج تجزئة وحدات الغلوتينين مرتفع الوزن الجزيئي بالرحلان الكهربائي.

مواد وطرائق البحث

Material and Methods

٤-١-المواد المستخدمة:

٤-١-١- أصناف القمح:

تم تأمين الأصناف النقية من القمح الديورم والطري من مراكز الأبحاث الموجودة في سورية المعنية بتطـوير زراعة القمح (جدول ٦)، بحيث أمّنت هذه المراكز اختلاف مناخي لظروف نمو العينات وتـوزع جغرافـي غطى المناطق الجنوبية والوسطى والشمالية لسورية وهذه المراكز:

١- المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ICARDA) - الحقول الاختبارية في منطقة تـل حديا- حلب، ولموسم حصاد 2008.

٢- الهيئة العامة للبحوث الزراعية في دوما - الحقول الاختبارية في منطقة دوما - دمشق، ولموسم حصـاد 2008

٣- مركز البحوث الزراعية في حمص - الحقول الاختبارية فـي منطقـة الـدوير - حمـص، لموسـمي حصاد 2007-2008.

جدول (٦): أصناف القمح المدروسة

النوع	الصنف	المصدر والعام	النوع	الصنف	المصدر والعام
ديورم	شام ١ Cham 1	دمشق، حلب، حمص 2008	طري	شام ٤ Cham 4	حلب، حمص 2008 حمص 2007
ديورم	شام ٣ Cham 3	دمشق، حلب، حمص 2008	طري	شام ٦ Cham 6	حلب، حمص 2008 حمص 2007
ديورم	شام ٥ Cham 5	دمشق، حلب، حمص 2008	طري	شام ٨ Cham 4	حلب، حمص 2008 حمص 2007
ديورم	بحوث ٥ Bohoth 5	حمص 2008	طري	شام ١٠ Cham 10	دمشق، حلب 2008 حمص 2007-2008
ديورم	بحوث ٧ Bohoth 7	دمشق، حمص 2008 حمص 2007	طري	بحوث ٤ Bohoth 4	دمشق، حمص 2008
ديورم	بحوث ٩ Bohoth 9	دمشق 2008	طري	بحوث ٦ Bohoth 6	حمص 2008
ديورم	بحوث ١١ Bohoth 11	دمشق 2008	طري	بحوث ٨ Bohoth 8	دمشق 2008
ديورم	دوما ١ Doma 1	دمشق، حمص 2008 حمص 2007	طري	دوما ٢ Doma 2	دمشق، حمص 2008 حمص 2007
ديورم			طري	جولان ٢ Golan 2	حمص 2007-2008

٤-١-٢- المواد الكيميائية : لاستخلاص بروتينات القمح وفصلها وفق تقنية الرحلان الكهربائي تم استخدام المواد التالية وذلك بدرجة النقاوة التحليلية الخاصة بالرحلان الكهربائي :

- أكريل أميد (Acrylamide) (Merck, Germany).
- بيس أكريل أميد bisacrylamide (*N,N'*-Methylenebisacrylamide) (Merck;Germany).
- أزرق كوماسي Coomassie blue R-250 (Merck;Germany)
- تريس tris (hydroxymethyl) methylamine (Merck, Germany)

- تيميد TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine) ($(CH_3)_2N(CH_2)_2N(CH_3)_2$) (BDH, England)
- كبريتات دوديسيل الصوديوم Sodium dodecyl sulfate (SDS: CH_3-$(CH_2)_{10}$-CH_2-O-SO_3^-, Na^+) (BDH, England)
- ثلاثي كلور حمض الخل Trichloroacetic acid (Merck, Germany).
- فوق كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2S_2O_8$ Ammonium Persulfate (BDH, England)
- أزرق بروموفينول Bromo Phenol Blue (BDH, England)
- غليسين Glycine (BDH, England)
- غليسرول Glycerol (Merck, Germany).
- حمض الخل الثلجي (Merck, Germany).
- ميتانول (Merck, Germany).
- (DTT, 1,4-Dithiothreitol) ($C_4H_{10}O_2S_2$) (Sigma, American)
- فينيل بيريدين Vinyl pyridine (BDH, England)
- البروبانول (2-propanol) (Merck, Germany).
- حمض كلور الماء (Merck, Germany).
- ايزوبوتانول (Isobutanol) (Merck, Germany).
- البروتينات المعيارية : هي عبارة عن مجموعة من البروتينات النقية معلومة الوزن الجزيئي من ماركة (BDH, England) وأوزانها الجزيئية تتراوح بين 13-103.8 KDa.الجدول (٧)

جدول (٧): البروتينات القياسية المستخدمة لتحديد الوزن الجزيئي لوحدات البروتينات التخزينية المفصولة وفق تقنية الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE)

البروتين	الوزن الجزيئي KDa
Phosphorylase b	103.8
Ovotransferin	90.15
Ovalbumin	50
Carbonic anhydrase	29.8
β-Lactoglobulin	22
Cytochrome C	13

٤-٢- طرق العمل :

٤-٢-١- تحضير المحاليل المستخدمة:

حُضرت محاليل استخلاص البروتينات والمحاليل الخاصة بالرحلان الكهربائي وفقاً لما هو وارد في المراجع (Pena *et al*., 1994; Leammli, 1 970) كالتالي:

١. محلول موقي (Buffer): تريس مع حمض كلور الماء (Tris – HCl) (1M, pH= 8.5, 6.8): يؤخذ 12.11g تريس في بالون معايرة سعة 100ml وتحل بكمية من الماء المقطر ثم يضبط pH المحلول بواسطة حمض كلور الماء المركز حتى تصبح قيمة الـ pH 6.8 أو8.5 ثم يتمم الحجم حتى الإشارة بالماء المقطر ويحفظ هذا المحلول عند 5-10 ºC.

٢. محلول كبريتات دوديسيل الصوديوم (10%): يحل 5g كبريتات دوديسيل الصوديوم بكمية من الماء المقطر ثم يتمم الحجم حتى 50ml، يحفظ المحلول عند درجة حرارة الغرفة.

٣. محلول الأكريل أميد المخزن الخاص بهلام الفصل وبهلام التكديس : يؤخذ 0.52g بيس أكريل أميد و 39.48g أكريل أميد وتحل في 70ml من الماء المقطر، ثم يتمم الحجم حتى 100ml. يُجانس المحلول ثم يفلتر قبل الاستخدام ويكون تركيز هذا المحلول (T=40%, C=1.3%)، ويحفظ عند 5-10 ºC.

٤. محلول البروبانول (50%, v/v) : يؤخذ 50ml من البروبانول ويضاف إليها 50ml من الماء المقطر.

٥. محلول فوق كبريتات الأمونيوم (1.5%): يحضّر هذا المحلول قبل الاستخدام مباشرة وذلك بحل 1.5gمن فوق كبريتات الأمونيوم في الماء المقطر ويتمم الحجم حتى 50ml.

٦. محلول الفصل Running Buffer: في بالون معايرة 1000ml يُؤخذ 30g تريس ثم يُضاف إليه 885ml من الماء المقطر مع التحريك المستمر على خلاط مغناطيسي ثم يُضاف 144g غليسين و10g كبريتات دوديسيل الصوديوم. يستمر التحريك حتى تجانس المحلول ويكون pH المحلول 8.3 ، وإلاّ فيضبط باستخدام حمض كلور الماء الممدد حتى القيمة المحددة.

٧. محلول التثبيت (ثلاثي كلور حمض الخل 12%): يحل 30gمن ثلاثي كلور حمض الخل في الماء المقطر ويكمل الحجم حتى 250ml.

٨. محلول الصبغ Staining Solution: يُحل 1.4g أزرق كوماسي بـ 400ml ميتانول ويتم المزج لمدة ساعة على خلاط مغناطيسي ثم يضاف 530ml ماء مقطر مع استمرار المزج ويضاف 70ml من حمض الخل الثلجي، يستمر المزج حتى التجانس ولمدة 3 hours.

٩. محلول الإذابة Dissolving Buffer :

A. الخاص بمستخلص الغلوتينين: يُذاب 12g من الغليسرول في 36ml ماء مقطر ويضاف مع التحريك المستمر 0.757g تريس بالإضافة إلى 1g كبريتات دوديسيل الصوديوم SDS و0.757g من DTT و6mg أزرق بروموفينول (التي تستخدم لمعرفة تقدم عملية الهجرة). يُضبط pH المحلول بواسطة حمض كلور الماء المركز عند قيمة pH=7.4 ثم بواسطة حمض كلور الماء الممدد إلى قيمة pH=6.8 وبعدها يتمم الحجم حتى 50ml بالماء المقطر.

B. الخاص بمستخلص الغليادين: يُحضّر كما المحلول السابق وإنما يضبط الـ pH عند قيمة pH=8 وبدون وجود DTT.

١٠. <u>محاليل استخلاص الغلوتينين:</u>

- <u>المحلول (آ)</u> : يؤخذ 4.844g تريس و 20g SDS ويذابان بـــ 400ml ماء مقطر ويضبط pH المحلول باستخدام حمض كلور الماء المركز عند pH=8 ، ثم يكمل الحجم حتى 500ml بالماء المقطر.
- <u>المحلول (ب)</u> : يؤخذ 2.5ml من المحلول (آ) مع 2.5ml من البروبانول (50%) ويضاف إليها 100mg من DTT ويتم المزج حتى تمام الانحلال.
- <u>المحلول (جـــ)</u> يُؤخذ 2.5ml من المحلول (آ) مع 2.5ml من البروبانول (50%) ويضاف إليها 100 µl من الفينيل بيريدين.

٤-٢-٢-*تحضير* المستخلصات البروتينية لتحليلها بطريقة SDS-PAGE (Pena *et al.*, 1994):

٤-٢-٢-١- استخلاص الغليادين :

تم استخلاص غليادين عينات القمح المختبرة بمحلول البروبانول 50%، حيث أخذت عدة حبات مـــن القمـــح، وطُحنت باستخدام مطحنة كهربائية معدة للاستخدام المنزلي وتم نخل الناتج على منخل بقطر 0.05mm، ثـــم أُخذ 40mg من الطحين وأضيف لها 1.5ml من البروبانول 50%. تم مزج الخلـــيط الســـابق لمـــدة 5min بواسطة رجّاج مخبري (LABNET, American)، ومن بعدها تم تحضين العينات عند درجة حرارة 65ºC ولمدة 20min بحاضنة (LABNET, American).. تـــم بعـــد ذلـــك تثفيـــل المـــزيج باســـتخدام مثفلـــة (Sigma1-14,Germany) لمدة 5min عند سرعة دوران 10000 rpm (59.8 x g)، ثم فُصـــل الجـــزء السائل وتم تبخيّر المذيب حتى تمام الجفاف عند الدرجة 80ºC وأضيف للناتج 300 µl من محلـــول الحقـــن الخاص بالرحلان الكهربائي (المحلول ٩-B). بعد المزج لمدة خمس دقائق، تم تحضين العينـــات عنـــد90ºC لمدة 5min ثم ثُفّل المزيج الناتج ليصبح المســـتخلص جـــاهز للفصـــل وفـــق تقنيـــة الـــرحلان الكهربـــائي SDS-PAGE

٤-٢-٢-٢- استخلاص الغلوتينين :

يؤخذ الراسب المتبقي بعد استخلاص الغليادين في المرحلة الســابقة ويضــاف إليــه 100 µl مــن محلــول استخلاص الغلوتينين (المحلول ب) . ثم يتم المزج لمدة 5min باستخدام الرجاج المخبري ومن بعــدها يــتم تحضين العينات عند درجة حرارة 65ºC ولمدة 30min ثم يثقل المزيج لمــدة 5min عنــد ســرعة دوران 10000 rpm (وهي تعادل 59.8 x g)، ثم يضاف 100µl من محلول الاستخلاص (المحلول جــ) ويمزج الخليط لمدة 5min ثم يُحضّن المزيج عند 65ºC لمدة 15min وأخيراً يثقل المزيج.

بعدها يؤخذ 100ml من طبقة السائل ويضاف إليها 100ml من محلول الحقــن (المحلــول ٩-A) ليصــبح مستخلص الغلوتينين جاهزاً للفصل وفق تقنية الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE).

٤-٢-٢-٣ تحضير محلول البروتينات القياسية :

تُحل البروتينات القياسية بــ 100µl من (المحلول ١٠- ب) و100µl من (المحلول ١٠- جــ) و250µl من محلول الحقن الخاص بمستخلص الغلوتينين(٩-A).

يمزج الخليط لمدة 5min باستخدام الرجاج المخبري ثم يحضن عند 100ºC لمــدة 2min وعنــدها يصــبح المحلول جاهز للحقن على هلام الرحلان الكهربائي.

ملاحظة: يمكن حفظ مستخلصات الغليادين والغلوتينين وكذلك محلول البروتينات القياسية عند5-10ºC وتبقــى هذه المستخلصات ثابتة إلى فترة تتجاوز 3Month إلى حين حقنها على هلام الرحلان الكهربائي.

تُعتبر مادة الأكريل أميد سامة ومؤذية للجلد لذلك يجب التعامل معها بحذر ولبس القفــازات لمنــع الــتلامس المباشر مع الجلد.

٤-٣-٢- *تجزئة* البروتينات التخزينية وفق تقنية SDS-PAGE

٤-٣-٢-١- مبدأ الطريقة:

يتم الرحلان الكهربائي على هلام بولي أكريل أميد بعد معاملة البروتينات بثنائي الثيوريتول (DTT) أو مركب ß-mercaptoethanol الذي يحطم الجسور الكبريتية بالبروتينات (لأنهما من المركبــات المرجعــة)، أمــا

كبريتات دوديسيل الصوديوم SDS (وهي منظف مشحون سلبا") فتُحطم الروابط الضعيفة بالجزيئة البروتينية كالروابط الهيدروجينية وتُوقف الارتباط الهيدروفوبي مما يؤدي إلى تفكيك نهائي للبنيــة الثالثيــة والثانويــة للبروتين وترتبط كبريتات دوديسيل الصوديوم بالبروتينات وتُكسبها شحنة سالبة أي تُصــبح البروتينــات ذات شحنة متماثلة. بعد معاملة مزيج البروتين بـ SDS والتسخين، تُجرى عملية الــرحلان الكهربــائي، فتنجــذب البروتينات نتيجة هذه المعاملة إلى القطب الموجب ويُعيق حركتها وجود الوسادة الهلامية، مما يؤدي إلى بطء انتقال الجزيئات البروتينية الكبيرة عن الجزيئات الأصغر وبذلك يمكن الوصول إلى فصل البروتينــات إلــى خطوط أو عصابات (Bands) بحسب وزنها الجزيئي أي تتدخل بالإضافة إلى قوى الهجرة الكهربائية قــوى الكروموتوغرافيا التقليدية في كفاءة الفصل.

٤-٣-٢-٢- تحضير هلام الفصل Separating Gel وهلام التكديس Stacking Gel:

تم فصل مستخلصات الغلوتينين والغليادين في هذا البحث على هلام الفصــل تركيــز (T=14%, C=0.45) وهلام التكديس تركيز 4.8% باستخدام جهاز رحلان كهربــائي عمــودي (Consort-56) وأبعــاد القالــب المخصص لتحضير الهلام هي 1 x 200 x 210 mm.

يستخدم عادة هلام التكديس لتركيز البروتين في مناطق ضيقة جدا" (narrow bands)، وذلك لتنظيم حركــة المستخلصات البروتينية وفق الشروط المطبقة للرحلان الكهربائي قبل وصول المستخلصات إلى هلام الفصل الذي يتم من خلاله فصل وحدات الغليادين والغلوتينين. ويكون عادة هلام التكديس ذو مسامات أكبر من هلام الفصل الذي يتم اختيار حجم ثقوبه طبقا" للوزن الجزيئي للبروتينات (المراد فصلها)، وذلــك بتغييــر تركيــز الأكريل أميد في المحلول.

A. <u>لتحضير **هلام الفصل**</u> يؤخذ 12.33ml من محلول تريس مع حمض كلور الماء (pH= 8.5) في أرلينــة صغيرة ويمزج مع 11.33ml من محلول الأكريل أميد المخزن (40%) و0.65% من كبريتات دوديسيل الصوديوم(10%) و7.78ml ماء مقطر. يتم المزج على خلاط مغناطيسي لمدة 2-4min ثــم يضــاف 1.3ml من محلول فوق كبريتات الأمونيوم المحضر حديثاً (1.5%) و15µl TEMED ويُمزج الخليط

بلطف. بعد التجانس تسكب محتويات الأرلينة في القالب المخصص لتحضير الهلام ويراعى عدم تـــرك فراغات هوائية ضمن القالب أثناء الصب. ثم يضاف بلطف 1ml من الإيزوبوتانول على سطح الهلام. يترك الهلام لمدة 45-60min حتى تتم بلمرة المحلول وتشكيل الهلام. يتم بعد ذلك إزالة الايزوبوتـــانول الموجود فوق سطح الهلام المتشكل و يغسل أعلى الهلام جيداً بالماء المقطر ومـــن ثـــم يجفـــف القالـــب باستخدام أوراق التجفيف المناسبة.

B. لتحضير **هلام التكديس** يُؤخذ 6.12ml من الماء المقطر مع 1.1ml محلول تريس مع حمض كلور الماء (pH=6.8) ومن محلول الأكريل أميد المخزن 1.05ml و0.09ml من كبريتات دوديســـيل الصـــوديوم (10%) و0.38ml من فوق كبريتات الأمونيوم (1.5%) ومن ثم TEMED 10µl. و بعد خلـــط هـــذه المكونات بتدويرها بلطف، يصب مزيج هلام التكديس ضمن القالب فوق هلام الفصل المحضر ســـابقا"، ويغرز المشط البلاستيكي المخصص لإحداث الفجوات ضمن هلام التكديس (وهي حجيرات يـــتم حقـــن المستخلص البروتيني فيها) بشكل لا يسمح ببقاء أي من فقاعات الهواء ضمن هذا الهلام. ننتظـــر حتـــى يتبلمر الهلام حوالي 30-40min ثم يسحب المشط بحذر لتجنب تمزق الهلام، كما يتم نزع جوان مـــانع التسرب المحيط بالهلام، وتغسل المناطق المحيطة بالهلام باستخدام محلول الجريان و يوضع القالب فـــي المكان المخصص على الجهاز. ويصبح الهلام جاهزاً لتجزئة المستخلصات البروتينية.

٤-٣-٢-٣- فصل المستخلصات البروتينية ضمن جهاز الرحلان الكهربائي:

تم فصل غليادين وغلوتينين القمح على النحو التالي :

١. يوضع القالب الذي يحمل هلام الفصل والتكديس في مكانه ضمن جهاز الرحلان الكهربائي.
٢. تملأ الحجرتين العلوية والسفلية في جهاز الرحلان بمحلول الجريان بكمية كافية بحيث يُغمر المحلول سطح هلام التكديس بشكل كامل ويكون على ارتفاع 2cm بالنسبة لقاعدة هلام الفصل.
٣. يؤخذ بواسطة سيرنغ 10 µl من كل مستخلص بروتيني ومن محلول البروتينـــات القياســـية، ويـــتم وضعها ضمن الحجيرات المتشكلة في هلام التكديس.

٤. ُيثبت غطاء جهاز الرحلان ثم يُربط مأخذ التيار الكهربائي مع مصدر الطاقة.

٥. يطبق فرق كمون بين الأقطاب بمقدار 180Volt وشدة تيار 20mA ويتم مراقبة درجة الحرارة بحيث لا تتجاوز 30ºC. تستمر عملية الفصل حتى وصول المستخلص إلى قاعدة الهلام ويتم التعرف على ذلك من خلال حركة المستخلصات (الملونة باللون الأزرق) على هلام الفصل وتستغرق هذه العملية ما يقارب 6-8Hours.

٦. ينزع القالب من الجهاز بعد انتهاء عملية الفصل ويحرر الهلام من الألواح الزجاجية، يُوضع الهلام في حاوية بلاستيكية تحوي محلول التثبيت (ثلاثي كلور حمض الخل 12%) وتوضع الحاوية على رجاج مخبري (Rotaterm-Germany) مع التحريك الخفيف لمدة 10min بسرعة 40rpm.

٧. ينقل الهلام إلى محلول التلوين ويترك ضمن هذا المحلول لمدة 3Hours مع التحريك اللطيف كما في المرحلة السابقة.

٨. يؤخذ الهلام ويغسل بالماء المقطر ثم يترك فيه لمدة 12-15Hours تحت التحريك الخفيف وذلك بهدف إزالة الفائض من التلوين فتظهر العُصابات المعبرة عن البروتينات المفصولة واضحة على هلام الفصل . يعتبر الهلام غير ثابت لفترة طويلة، وتبدأ العصابات بالتداخل مع بعضها بازدياد زمن التخزين.

٤-٤- تقييم النتائج :

٤-٤-١- تقييم النتائج من خلال صورة هلام الفصل:

يجفف هلام الفصل قليلاً باستخدام ورق ترشيح ثم يوضع على الماسحة الضوئية Scanner لنقل الصورة إلى الكمبيوتر ويتم تقييم النتائج من خلال عدد وترتيب العُصابات البروتينية التي تظهر على شريط الرحلان الكهربائي الخاص بكل مستخلص، ويتم أيضاً تحديد الحركة النسبية لكل عُصابة R_f (نسبة المسافة التي تقطعها على هلام الفصل إلى المسافة الكلية للهجرة على هلام الفصل)، كما وتُحدد كثافة العُصابة من خلال برنامج Scion Image.

٤-٤-٢- تقييم النتائج من خلال معالجة صورة هلام الفصل ببرنامج Scion Image :

يُفيد برنامج Scion Image إصدار شركة (IBMPC) في تحويل صورة هلام الـرحلان الكهربـائي إلـى مخطط يضم مجموعة من القمم تُقابل العُصابات الظاهرة على شريط الفصل، تتناسب مساحة كـل قمـة مـع الكثافة اللونية للعُصابة المقابلة وبالتالي يمكن تحديد الوحدات البروتينية كمياً وذلك بعد حساب مساحة كل قمة ونسبها إلى القيمة الإجمالية لمجموع مساحات القمم التي تظهر في المخطط. تسمح هذه المخططات بالمقارنـة بين نتائج تجزئة أصناف القمح المختلفة، كما يُفيد التحديد الكمي للوحدات البروتينية فـي إجـراء الدراسـات الإحصائية لتحديد أقل فرق معنوي لتأثير بعض المتغيرات (اختلاف موقع نمو صنف القمح وسنة النمو) على نتائج تجزئة البروتينات التخزينية.

٤-٤-٣- التحليل الإحصائي ببرنامج SPSS 14 :

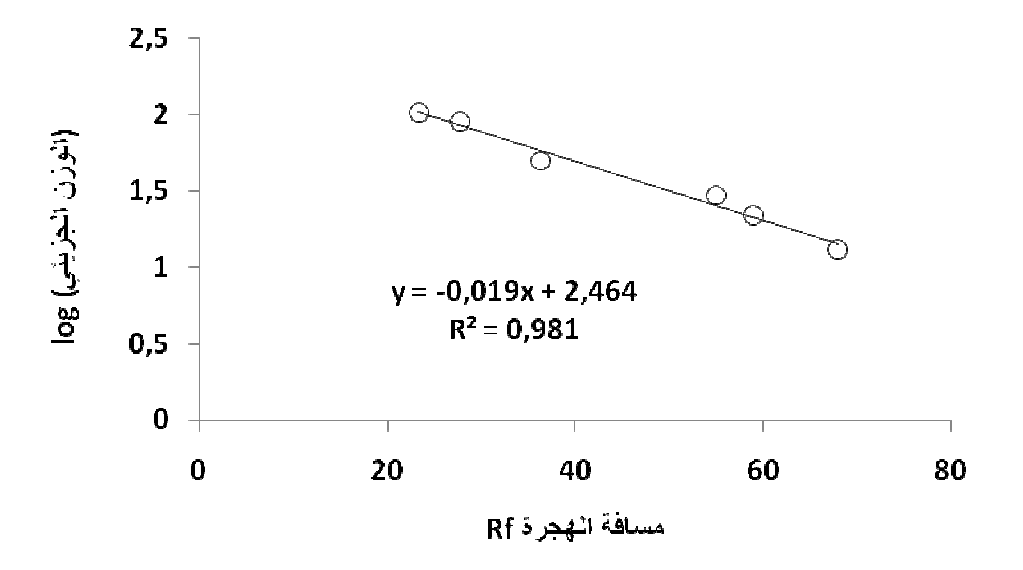
يفيد هذا البرنامج في تحديد أقل فرق معنوي للعامل المتغير (موقع، وسنة النمو) على نتائج تجزئة البروتينات التخزينية بالاعتماد على النسبة المئوية للوحدات البروتينية الظاهرة في مخططات تجزئة البروتينات التخزينية.

٤-٤-٤- دراسة التشابه والارتباط ببرنامج Minitab :

تم التقييم الإحصائي للنتائج التي تم التوصل إليها بواسطة برنـامج إحصـائي (Minitab Release 11 for Windows) إصدار 2001 والذي يسمح بتحديد مدى التشابه والاختلاف بين الأصناف. ولأجل ذلك تم إعداد جدول يضم جميع الوحدات البروتينية التي تظهر على هلام الرحلان، عنـد تجزئـة البروتينـات التخزينيـة لأصناف القمح المدروسة، مرتبة بحسب الحركة النسبية على هلام الفصل، كما احتوى الجدول علـى النسـبة المئوية لمساحة كل عُصابة ، وقد تم الحصول على هذه النسب من برنامج Scion Image ومن خلال هـذه البيانات وباستخدام برنامج Minitab نحصل على مخطط يظهر فيه أسماء أصناف القمح المدروسـة علـى المحور X وتحدد نسبة التشابه بين الأصناف على المحور Y.

٤-٤-٥- تحديد الأوزان الجزيئية للوحدات البروتينية الظاهرة على مخططات تجزئة البروتينات التخزينيـــة وفق تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE.

يتم من خلال تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE تحديد الأوزان الجزيئية للوحدات البروتينية التي تظهر في هلام الرحلان وذلك بالاستفادة من المنحني القياسي الذي يربط بين لوغاريتم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية النقية المعلومة مع حركتها النسبية على هلام الرحلان الكهربائي (الشكل ٤).



الشكل (٤) علاقة هجرة البروتينات المعيارية مع الوزن الجزيئي

بعد معرفة الحركة النسبية لكل عُصابة، وبالاعتماد على المخطط البياني السابق، يتم تحديد الـــوزن الجزيئـــي للوحدات البروتينية الظاهرة على هلام الرحلان الكهربائي.

النتائج والمناقشة

Results and discussion

٥ – ١– تأثير تغير الموقع الجغرافي على نتائج تجزئة الغليادين والغلوتينين بالرحلان الكهربائي SDS-PAGE:

دُرس تأثير تغير الموقع الجغرافي لنمو النبات على نتائج تجزئة البروتينات التخزينية (الغليادين والغلوتينين) لعدة أصناف من القمح والتي تم الحصول عليها من عدة مواقع غطت المناطق الشمالية (حقول ICARDA بحلب) والمناطق الجنوبية (حقول البحوث الزراعية بدوما) والمنطقة الوسطى (حقول البحوث الزراعية بحمص). وقد تم اختيار أربعة أصناف من أصناف القمح المدروسة وهي شام١، شام٣، شام٥، شام١٠، من أجل دراسة تأثير اختلاف الموقع الجغرافي على نتائج تجزئة الغليادين، أما بالنسبة للغلوتينين فقد تم اختيار خمسة أصناف من القمح وهي شام١، شام٣، شام٥، شام١٠ وبحوث٧.

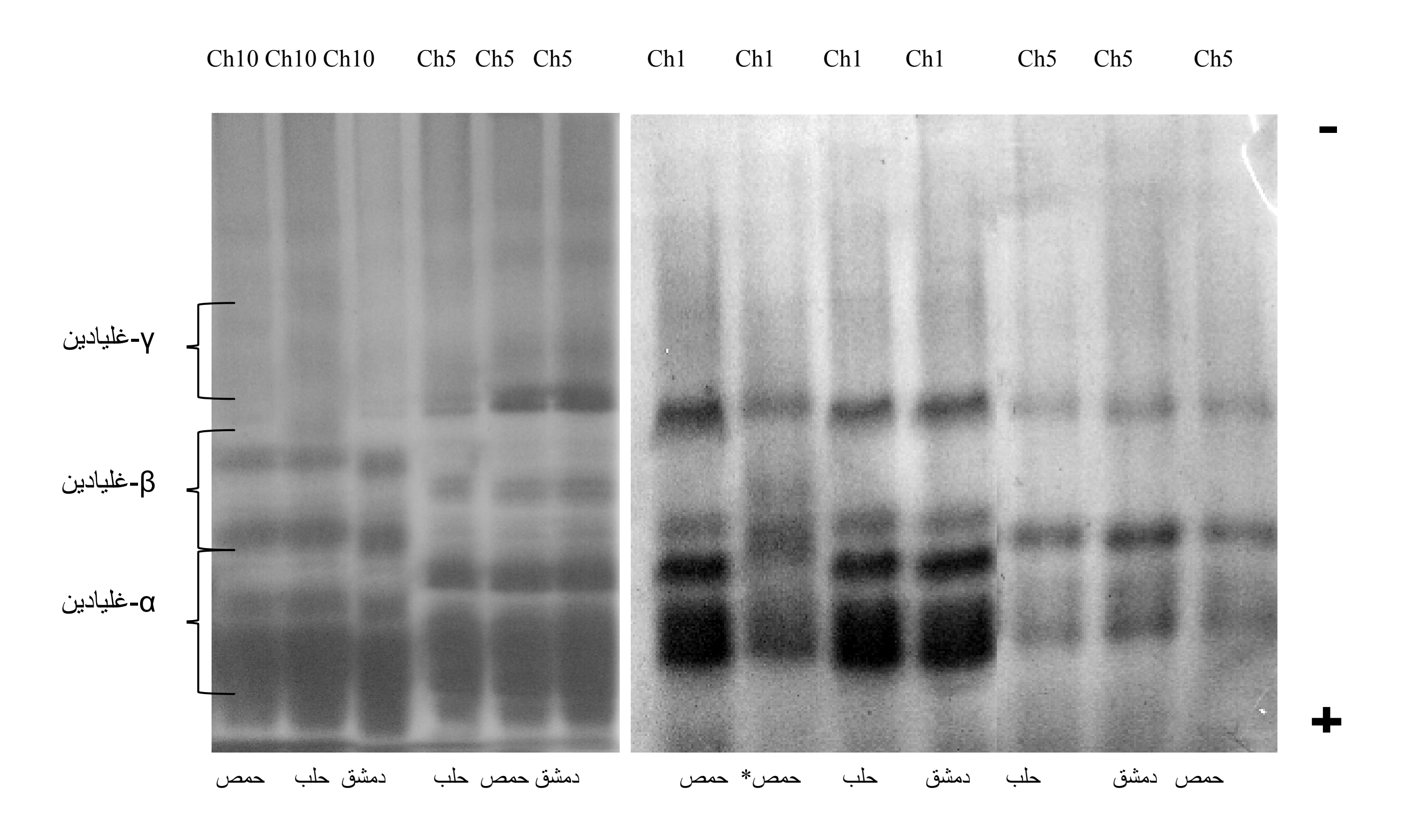
٥–١–١– تأثير تغير الموقع الجغرافي على نتائج تجزئة الغليادين بالرحلان الكهربائي SDS-PAGE :

٥–١–١–١– نتائج الرحلان الكهربائي

تم تحليل الغليادين إلى مركباته الأساسية بالرحلان الكهربائي حيث تعبر الشرائط المتشكلة والموضحة في الشكل (٥) عن نتائج تحليل كل عينة من العينات المدروسة، كما تعبر العُصابات الظاهرة في كل شريط عن عن الوحدات البروتينية المكوّنة للغليادين.

يلاحظ على شريط الرحلان الكهربائي، وبشكل خاص في مناطق فصل الغليادين (α و β و γ –غليادين)، التطابق في عدد وترتيب الوحدات البروتينية لعينات صنف القمح الواحد المأخوذة من المواقع الجغرافية المختلفة. حيث يُظهر الشكل (٥) أنّ تحت الوحدات البروتينية الناتجة عن تجزئة غليادين عينة صنف القمح شام–٣ والذي تم الحصول عليه من مركز بحوث حمص، مطابقة من حيث العدد والترتيب والكثافة لمقابلاتها في عينات الصنف ذاته ولكن من موقع جغرافي مختلف عن العينة السابقة (دمشق، حلب) وهذا ما يلاحظ أيضا" بالنسبة للأصناف الأخرى (شام١، شام٥، شام١٠). بالإضافة لذلك يُظهر الشكل (٥) الاختلاف بعدد

وترتيب الوحدات البروتينية بين الأصناف المدروسة، مما يعني أن لكل صنف من أصناف القمح، تركيب غليادين خاص به يختلف عن الأصناف الأخرى. و هذا يأتي متفقاً مع نتائج دراسات سابقة بينت أن تركيب غليادين صنف القمح المدروس هو ثابت ويتعلق بعوامل وراثية تخص الصنف الواحد ولا يتأثر بموقع نمو النبات (Zillman and Bushuk, 1979b; Robet and Clements ,1987).



الشكل (٥): تأثير الموقع الجغرافي على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غليادين أصناف القمح شام١، شام٣، شام٥، شام١٠، من مواقع (دمشق، حلب، حمص)(حمص*:مستخلص الغليادين لحبة واحدة)

من ناحية أخرى، يُبين (الشكل٥) تراص والتصاق العُصابات الممثلة للوحدات البروتينية المفصولة في منطقتي α و β–غليادين وخاصة α–غليادين بعكس عُصابات γ –غليادين، وقد أشارت دراسات عديدة إلى ذلك موضحةً أن طريقة الرحلان الكهربائي أحادي البعد لا تكفي لفصل الوحدات البروتينية α و β–غليادين، إنما يفضل إجراء الرحلان الكهربائي ثنائي البعد من أجل فصل أوضح (Dunbar *et al* 1985; Lafiandra and Kasarda, 1985). كما أن تحت الوحدات البروتينية الظاهرة في منطقتي α– وβ– غليادين تختلف أحيانا" مع

تكرار التجربة، ولذلك لدراسة تأثير المتغيرات على نتائج تجزئة الغليادين، اكتفينا بمقارنة عدد وترتيب الوحدات البروتينية الظاهرة على جل الرحلان الكهربائي ذاته، وكذلك عدد وشكل القمم التي تظهر في المخططات البيانية الناتجة عن معالجة صورة شريط الفصل وفق برنامج Scion Image ومن ثم حساب نسبة التشابه الناتجة وفق برنامج Minitab.

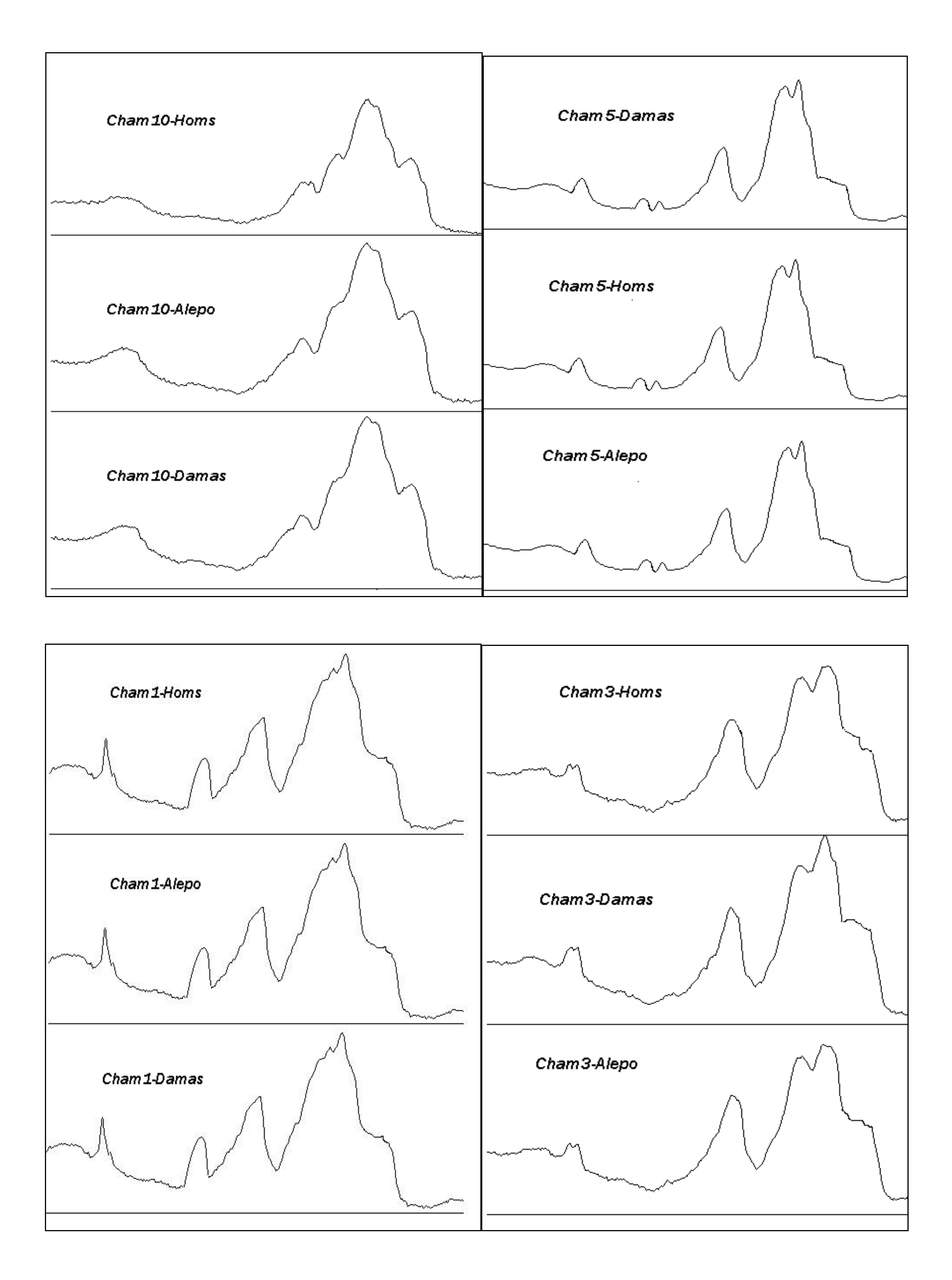
٥-١-١-٢- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Scion Image

بهدف المقارنة الأدق بين الأصناف المدروسة، تم الاستعانة ببرنامج Scion Image إذ يعطي هذا البرنامج مخطط بياني تظهر فيه الوحدات البروتينية المفصولة على شكل قمم تتناسب مساحتها مع الكثافة اللونية للعُصابة المقابلة على شريط الفصل. المحور الأفقي في المخطط البياني المبين في الشكل (٦) يقابل مسافة الهجرة على جل الفصل، أما المحور الشاقولي فيدل على كثافة العصابة.

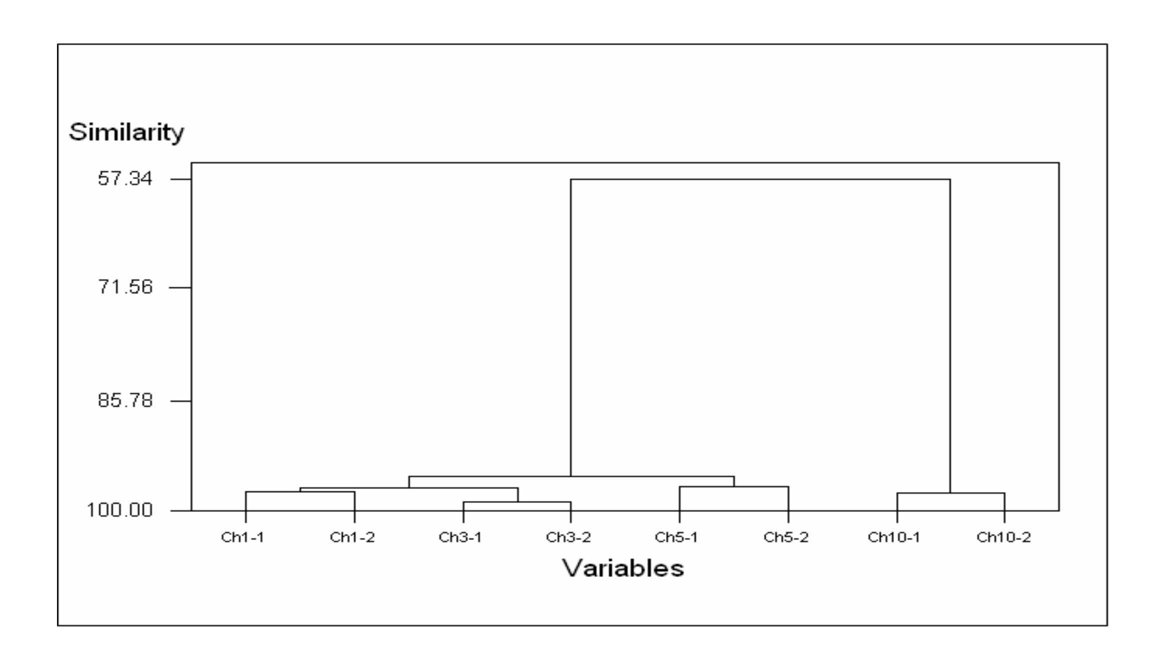
يتضح من خلال المخططات الواردة في الشكل (٦) تطابق ترتيب وعدد القمم الممثلة للوحدات البروتينية المفصولة في مخططات عينات الصنف الواحد المزروع في مناطق مختلفة، بينما يلاحظ اختلافها بين الأصناف.

٥-١-١-٣- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Minitab

لتحديد نسبة التشابه والارتباط بين نتائج الرحلان الكهربائي للصنف الواحد والمزروع في مناطق مختلفة، تم معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Minitab وفق ما تم شرحه سابقا" (فقرة ٤-٤-٤ عملي)، فحصلنا على المخطط المبينة في الشكل (٧).



الشكل (٦): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي لغليادين لأصناف القمح (شام١٠، شام٥، شام٣، شام١) ببرنامج Scion Image



الشكل (٧): نسبة التشابه والارتباط بين أصناف القمح المدروسة (شام١، شام٣، شام٥، شام١٠) والمأخوذة من موقعي (حلب، حمص) وفق برنامج **Minitab** (يُشير الرقم١: إلى العينات المأخوذة من حلب والرقم ٢ إلى العينات المأخوذة من موقع حمص)

تبين النتائج التي تم الحصول عليها (الشكل٧) أن نسبة التشابه بين عينات الصنف الواحد والمأخوذة من مواقع جغرافية مختلفة قد بلغت تقريبا" 97% وهذا التشابه الكبير يؤكد النتائج الواردة سابقا" والتي بينت عدم تأثير اختلاف موقع نمو النبات على تركيب الغليادين. كما يلاحظ ارتفاع نسبة التشابه (~95%) بين عينات القمح المدروسة والتي تعود لصنف الديورم (شام١، شام٣، شام٥) بينما تنخفض نسبة التشابه لتصل 57% بين صنف القمح الطري شام١٠ وبقية أصناف القمح الديورم المدروسة.

٥-١-١-٤- التحليل الإحصائي لنتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج SPSS 14:

نظراً لعدم كفاءة الفصل في منطقتي α وβ-غليادين بطريقة الرحلان الكهربائي أحادي البعد، لم نتمكن من إجراء تحليل إحصائي لتحديد أقل فرق معنوي لتغيير الموقع الجغرافي على نتائج تجزئة الغليادين.

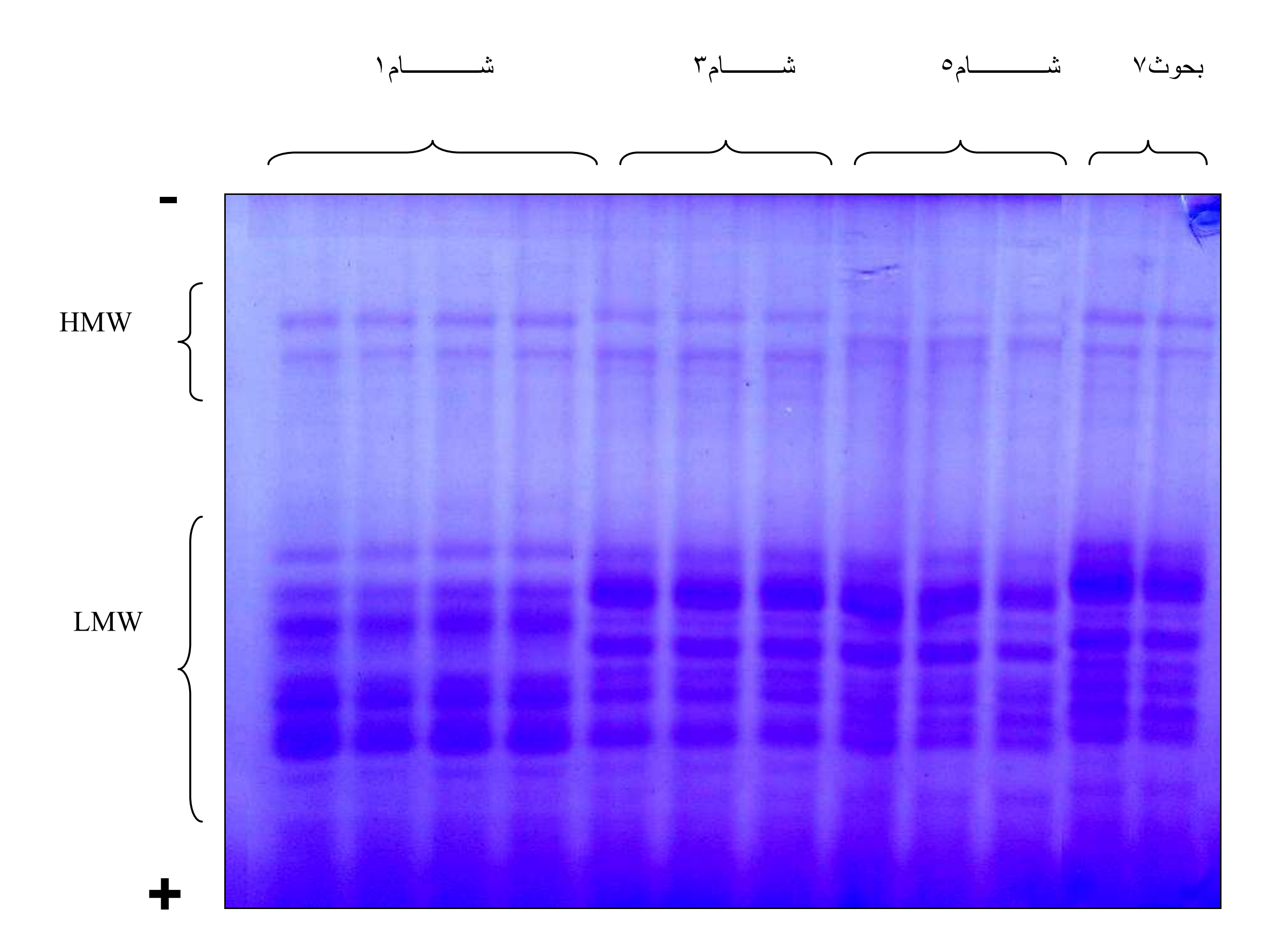
٥-١-٢- تأثير تغير الموقع الجغرافي على نتائج تجزئة الغلوتينين بالرحلان الكهربائي SDS-PAGE:

٥-١-٢-١- نتائج الرحلان الكهربائي:

إن تطبيق تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE لتجزئة غلـوتينين أصـناف القمـح شـام١، ٣، ٥، ١٠، وبحوث٧ بيّنت وجود منطقتين: الأولى منطقة وحدات الغلوتينين مرتفعة الـوزن الجزيئـي HMW والتـي

تتراوح أوزانها الجزيئية (60-130KDa)وهذا يتوافق مع أبحاث سابقة (;BURNOUF and Bouriquet,2004 Duponta and Altenbach, 2003). أما الحركة النسبية لهذه الوحدات (نسبةً لمسافة الهجرة الكلية علـــى جـــل الفصل) (R_f ~ 20-35%). والمنطقة الثانية هي منطقة وحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئـــي LMW (30KDa) وما دون، والتي كانت الحركة النسبية لها (R_f ~ 50-75%)..

بيّنت النتائج تطابق عدد وترتيب وكثافة العُصابات الناتجة عن فصل غلوتينين صنف القمح الواحد بالرغم من اختلاف موقع النمو. كما يُلاحظ في مخططات فصل الغلوتينين المبينة في الشكل (٨) أن عينات صنف القمح شام١ تحتوي عُصابتين أساسيتين في منطقة HMW: العصابة الأولى ذات حركة نسبية 25.75% و الثانيـــة 29.6%، ولصنف القمح شام٣ يُلاحظ وجود عصابتين عند (23.5, 29.6%) أما لعينات صنف القمح شام ٥ فتظهر عُصابتين عند حركة نسبية(27.4, 29%) وللصنف بحوث٧ تظهر العُصابتين بحركة نسبية مماثلة لتلك التي تظهر في صنف القمح شام١ (الجدول ٨).



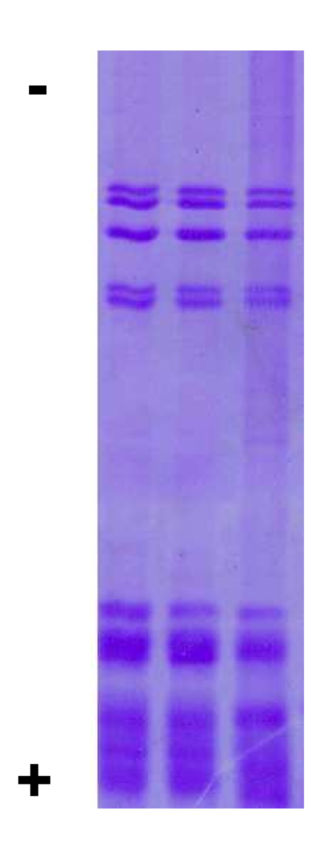
الشكل (٨): تأثير الموقع الجغرافي على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غلوتينين أصناف القمح (شام١، شام٣، شام٥، بحوث٧) من مواقع (دمشق، حلب، حمص)

(حمص* مستخلص الغلوتينين لحبة واحدة)

الجدول (٨): الوحدات البروتينية (HMW) الظاهرة في مخططات تجزئة الغلوتينين لبعض أصناف القمح مع مسافة الهجرة المقابلة لكل منها

وحدات HMW	الحركة النسبية على جل الفصل (%) لأصناف القمح المدروسة			
	شام١	شام٣	شام٥	بحوث٧
الأولى	25.75	23.5	27.4	25.75
الثانية	29.6	29.6	29	29.6

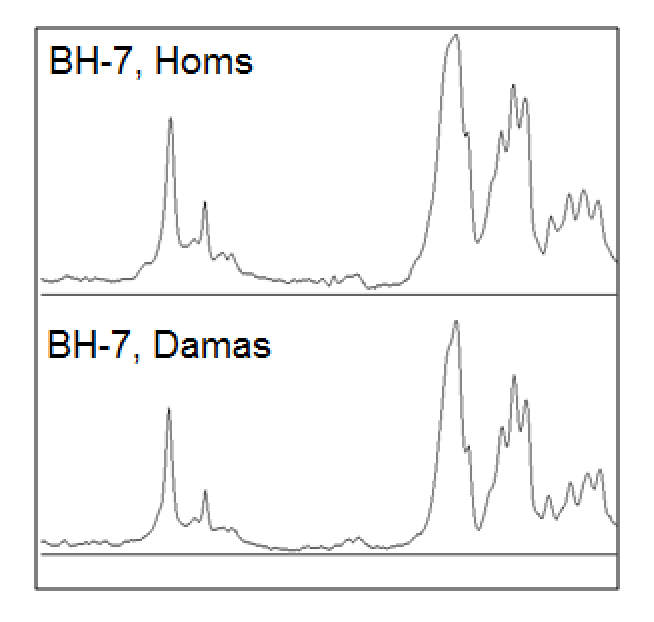
أما بالنسبة لصنف القمح الطري شام١٠، فقد تم تمييز خمس تحت وحدات بروتينية في منطقة HMW عنـد مسافة هجرة (20.9, 23, 25.75, 31, 32.1%) وظهرت جميع هذه الوحدات في مكررات الصنف المأخوذة من الموقع الثلاثة (دمشق، حلب، حمص).



الشكل (٩): تأثير الموقع الجغرافي على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غلوتينين عينات صنف القمح (شام١٠) من مواقع (حمص، دمشق، حلب)

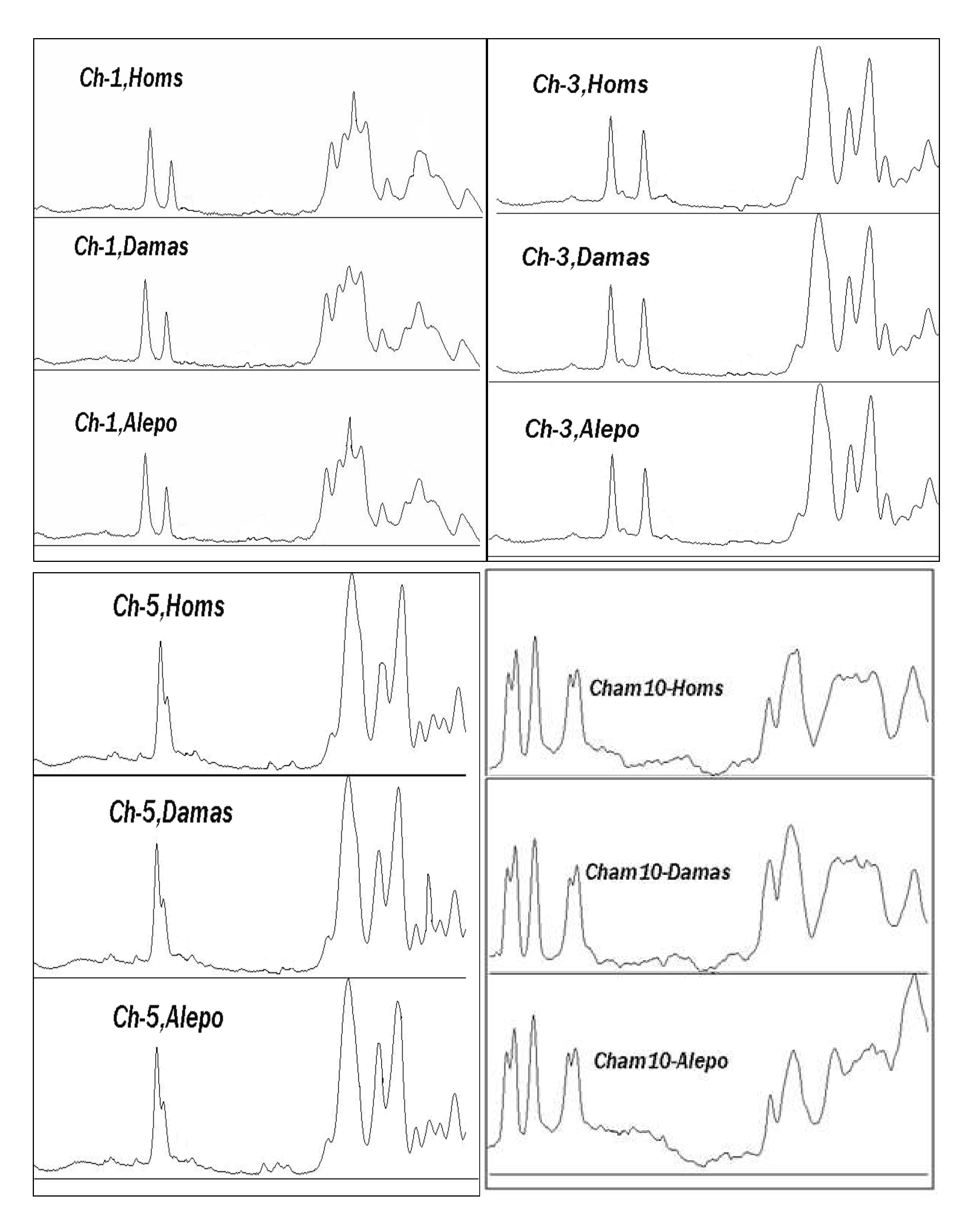
٥-١-٢-٢- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Scion Image

بالاستعانة ببرنامج Scion Image تمت معالجة صورة جل الرحلان الكهربائي الـذي يبـين نتـائج فصـل غلوتينين عينات أصناف القمح المدروسة والمأخوذة من المواقع الجغرافية الثلاثة. تؤكد النتائج الموضحة فـي الشكل (١٠) على التطابق في عدد وترتيب وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW وكذلك في عدد وترتيب وحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي (LMW) لعينات الصنف الواحد المفصولة علـى جـل الفصل ذاته.



الشكل (10-A): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغليادين صنف القمح

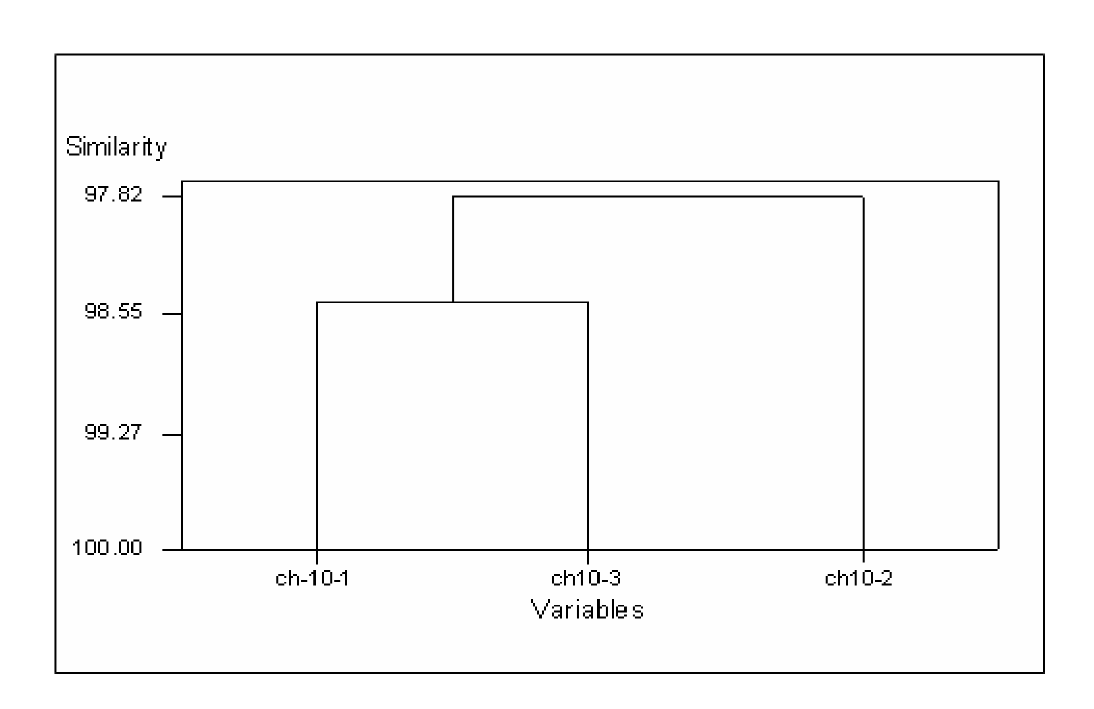
(بحوث ٧، من مواقع دمشق– حمص)



الشكل (10-B): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغليادين أصناف القمح (شام١، شام٣، شام ٥، شام ١٠ من مواقع دمشق- حمص-حلب)

٥-١-١-٣- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Minitab

عند حساب نسبة التشابه والارتباط وفق برنامج Minitab وبالاعتماد على النسبة المئوية لمساحة كل عُصابة تظهر في مخططات تجزئة غلوتينين ثلاث عينات لصنف القمح شام١٠ من مواقع جغرافية مختلفة، بلغت نسبة التشابه 98%~ بين العينتين المأخوذتين من حمص ودمشق، بينما بلغت نسبة التشابه 97% بين العينتين السابقتين وبين العينة المأخوذة من حلب (الشكل١١)، وهذا يؤكد أيضاً بأن تغيير الموقع الجغرافي لا يحمل تأثيراً على نتائج تجزئة الغلوتينين. تجدر الإشارة إلى أننا لم نتمكن من حساب نسبة التشابه لبقية الأصناف المدروسة نظراً لوجود عصابتين فقط في منطقة تحت وحدات البروتينية مرتفعة الوزن الجزيئي (HMW)، ويقوم برنامج Minitab المستخدم بدراسة التشابه والإرتباط بين عدد من الأصناف يُساوي عدد المتغيرات ناقص واحد.



الشكل (١١): نسبة التشابه والارتباط لعينات صنف القمح شام١٠، والمأخوذة من ثلاثة مواقع جغرافية (حمص، حلب، دمشق) (يُشير الرقم١: إلى العينات المأخوذة من حمص والرقم ٢ إلى العينات المأخوذة من حلب والرقم ٣ إلى العينات المأخوذة من دمشق)

٥-١-٢-٤- التحليل الإحصائي لنتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج SPSS 14:

نظرا" لكثرة عدد العصابات الممثلة لوحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي (LMW)، بالإضافة إلى تكدس العصابات في هذه المنطقة، فقد اعتمدنا على وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي (HMW) لتحديد أقل فرق معنوي لتأثير اختلاف الموقع الجغرافي لنمو النبات في نتائج تجزئة الغلوتينين، إذ يكون عدد وحدات الغلوتينين المرتفعة الوزن الجزيئي ضمن الصنف الواحد ثابت عند تكرار التجربة، بالإضافة إلى إمكانية التحديد الكمي لهذه الوحدات بمساعدة برنامج Scion Image.

عند حساب النسبة المئوية لوحدات (HMW) التي تظهر في عينات صنف القمح شام١ المأخوذة من ثلاثة مواقع جغرافية، وإجراء التحليل الإحصائي وفق برنامج SPSS14 حصلنا على النتائج الموضحة في الجدول(٩).

الجدول(٩): النسبة المئوية لوحدات HMW الظاهرة في مخططات الفصل لعينات صنف القمح شام١ من المواقع الجغرافية الثلاثة

	حمص	دمشق	حلب
الوحدة البروتينية الأولى	69.21±0.84 a	70.27±0.471 a	69.708±0.55 a
الوحدة البروتينية الثانية	30.259±1.048 a	29.73±0.471 a	30.636±0.414 a

a , b , c الأحرف المتشابهة ضمن السطر الواحد يعني لا يوجد فروق معنوية عند $P \leq 0.05$.

a , b , c الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد يعني يوجد فروق معنوية عند $P \leq 0.05$.

من نتائج الجدول(٩) يتضح بأن تغيير الموقع الجغرافي لم يحمل تأثير معنوي على وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي (HMW) التي تظهر في مخططات تجزئة غلوتينين صنف القمح الديورم شام١، وهذا يتوافق مع نتائج (Hassan *et al.*, 2007) الذي بيّن أن عدد وترتيب الوحدات البروتينية الناتجة عن تجزئة البروتينات التخزينية لا يتأثر بتغير موقع نمو النبات، وبيّنت دراسات أخرى بأن الاختلاف الذي يمكن أن يُلاحظ يكون بكثافة هذه الوحدات البروتينية فقط (Anjum *et al*, 2000) و قد بُرهن في هذه الدراسة على أن هذا الاختلاف ليس له دلالة إحصائية عند مستوى دلالة 5%.

وبالمثل عند إجراء تحليل إحصائي وفق برنامج SPSS14 لوحدات الغلوتينين الخمس مرتفعة الوزن الجزيئي والتي تظهر في مخططات تجزئة غلوتينين صنف القمح الطري شام١٠ والمأخوذ من ثلاثة مواقـع جغرافيـة مختلفة، تبين أيضاً بأن تغيير الموقع الجغرافي لا يحمل تأثير معنوي على نتائج تجزئة غلوتينين هذا الصنف.

الجدول(١٠): النسبة المئوية لوحدات HMW الظاهرة في مخططات الفصل لعينات صنف القمح شام١٠ من المواقع الجغرافية الثلاثة

الوحدة البروتينية	حمص	دمشق	حلب
الأولى	4.64±0.95 a	4.653±0.85 a	4.883±0.55 a
الثانية	22.75±0.72 a	23.153±0.47 a	24.94±0.6 a
الثالثة	53.247±2.47 a	52.76±1.7 a	52.19±0.45 a
الرابعة	10.373±1.67 a	9.34±0.91 a	9.077±1.23 a
الخامسة	8.85±3.07 a	10.093±2.63 a	8.957±1.4 a

a , b , c ... الأحرف المتشابهة ضمن السطر الواحد يعني لا يوجد فروق معنوية عند $P \le 0.05$.

a , b , c ... الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد يعني يوجد فروق معنوية عند $P \le 0.05$.

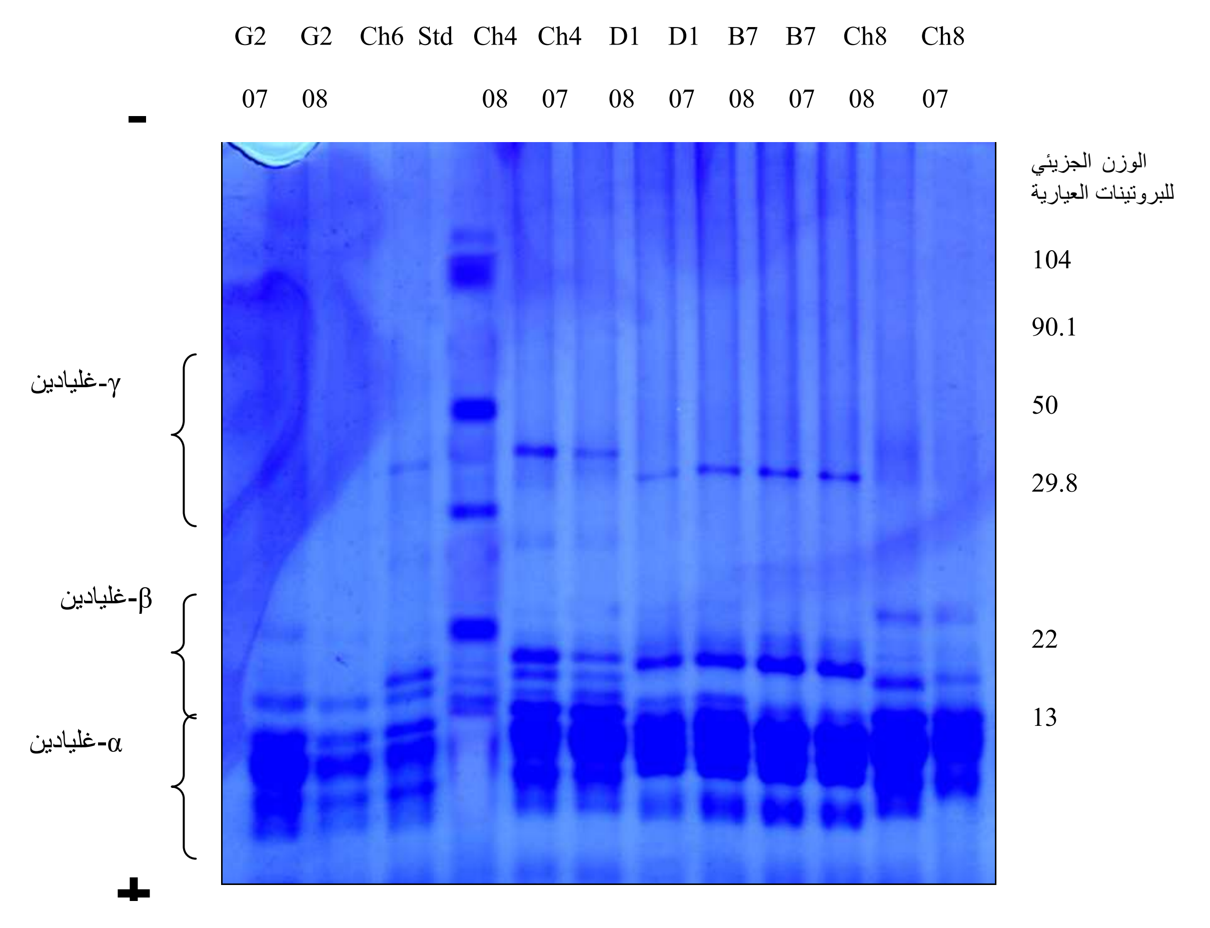
٥-٢- تأثير اختلاف سنة النمو على نتائج تجزئة الغليادين والغلوتينين وفق تقنية الرحلان الكهربائي

من أجل دراسة تأثير اختلاف سنة النمو على نتائج تجزئة الغليادين أخذت عينتين لكل صنف من أصناف القمح الخمسة (دوما١، جولان٢، بحوث٧، شام٤، شام٨). ومن موسمي نمو (2008-2007)، أما بالنسبة للغلوتينين فقد تم اختيار أربعة أصناف من القمح (شام١٠، جولان٢، دوما٢، شام٦)، وأخذت عينتين لكل صـنف مـن موسمي نمو (2008-2007).

٥-٢-١- تأثير اختلاف سنة النمو على نتائج تجزئة الغليادين :

٥-٢-١-١ نتائج الرحلان الكهربائي

بعد استخلاص الغليادين وتجزئته وفق تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE حصلنا على النتائج المبينة في الشكل (١٢)، والتي توضح أن عدد وترتيب تحت الوحدات البروتينية الظاهرة في جل الفصل لا يتأثر باختلاف سنة النمو وهو متطابق لعينات صنف القمح الواحد.



الشكل (١٢): تأثير اختلاف سنة النمو على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غليادين أصناف القمح (دوما١، جولان٢، بحوث٧، شام٤، شام٨) من موسمي (٢٠٠٧، ٢٠٠٨)

(اختصارات تسمية الأصناف في أعلى صورة الجل **Ch**:شام، **B**: بحوث، **D**: دوما، **G**: جولان، **St**: بروتين قياسي)

نجد على سبيل المثال، أن العُصابات الظاهرة في شريط فصل غليادين عينة القمح من صنف شام٤ من موسم 2007 ، مماثلة للعُصابات الناتجة عن تجزئة غليادين عينة القمح من الصنف ذاته ولكن من موسم2008.

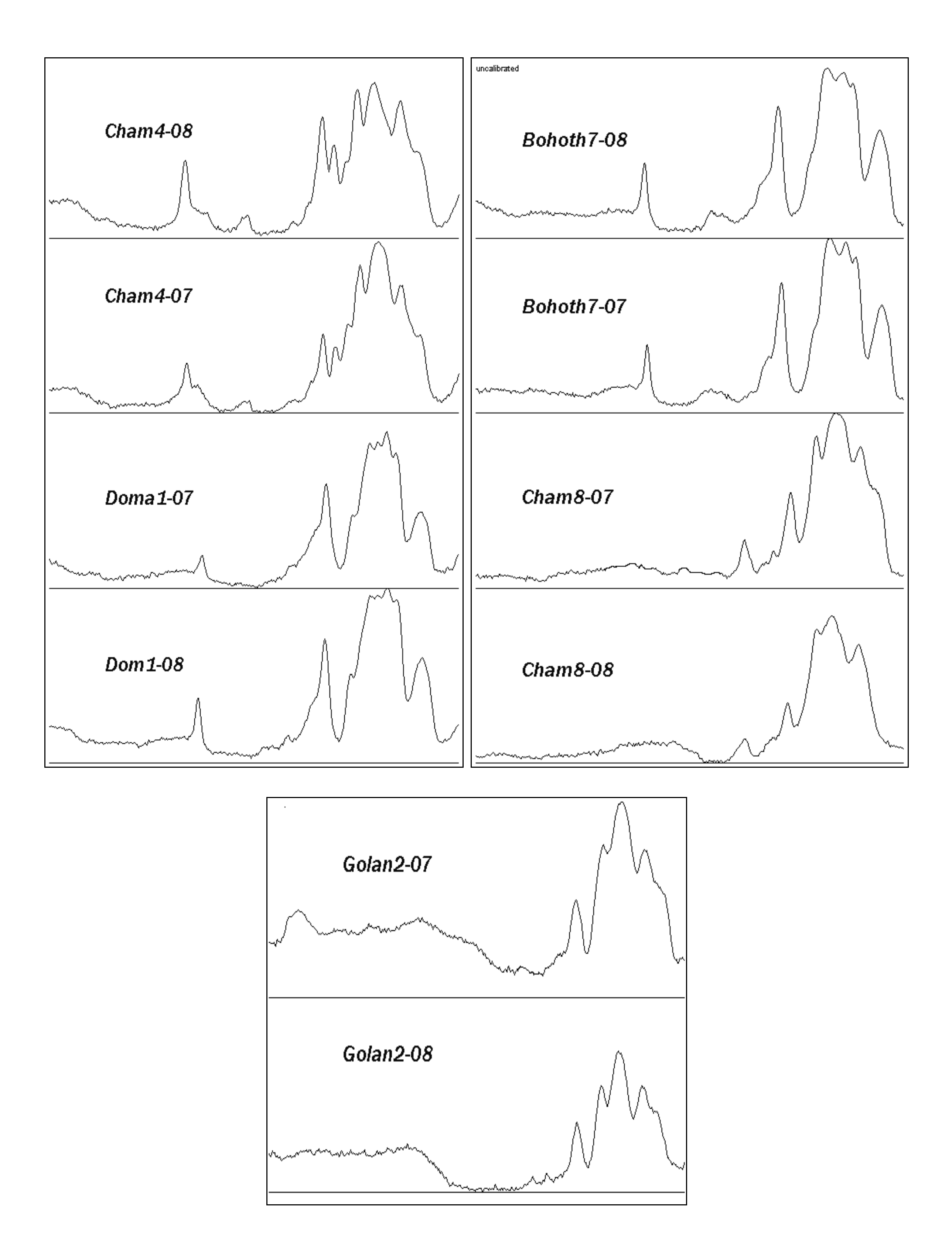
وينطبق هذا على بقية الأصناف، وقد يلاحظ اختلاف بكثافة بعض العُصابات الضعيفة (عينات صنف القمح شام٨).

٥-٢-١-٢ معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Scion Image

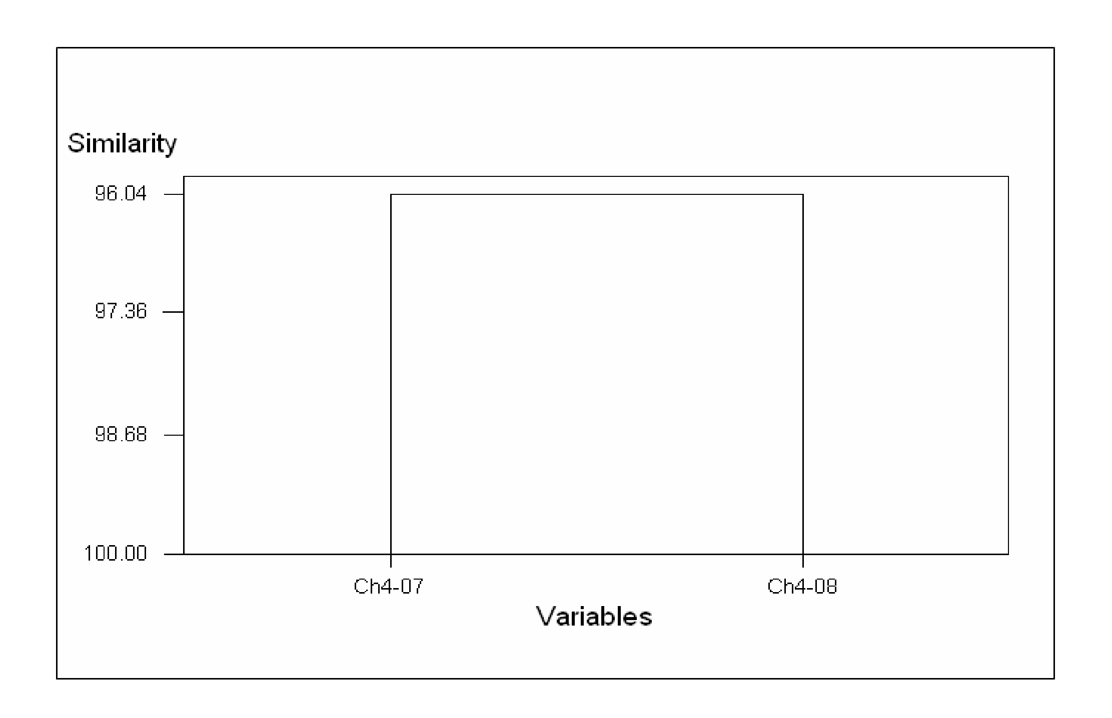
لمقارنة كثافة وعدد تحت الوحدات البروتينية الظاهرة في جل الرحلان الكهربائي للعينات المدروسة، تم معالجة صورة جل الرحلان بواسطة برنامج Scion Image. يتضح من الشكل (١٣) ظهور سبع قمم تُعبّر عن تحت الوحدات البروتينية السبع الظاهرة في شريط الرحلان الكهربائي عند تجزئة مستخلص الغليادين لعينات صنف القمح شام٤ من موسمي نمو (2007-2008)، ويلاحظ الاختلاف في كثافة بعض الوحدات البروتينية المتقابلة، وهذا ينطبق على نتائج تجزئة بقية الأصناف المدروسة.

٥-٢-١-٣ معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Minitab

لحساب نسبة التشابه بين نتائج تجزئة عينتي صنف قمح (وليكن شام٤، من موسمي 2007,2008) ، تم معالجة النتائج ببرنامج Minitab، ومن المخطط الناتج يتضح أن نسبة التشابه بين عينتي الصنف الواحد (شام٤) بلغت 96%~ (الشكل١٤)، وبالتالي ليس هناك تأثير معنوي لاختلاف سنة النمو على نتائج فصل الغليادين. وأمّا نسبة التشابه لعينات أصناف القمح (بحوث٧، دوما١، جولان٢) ولموسمي النمو المدروسين، فقد اقتربت لأن تكون 100%~.



الشكل (١٣): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي لغليادين بعض أصناف القمح (شام ٤، شام ٨، دوما١، بحوث٧، جولان٢) من موسمي نمو (٢٠٠٨،٢٠٠٧) ببرنامج Scion Image

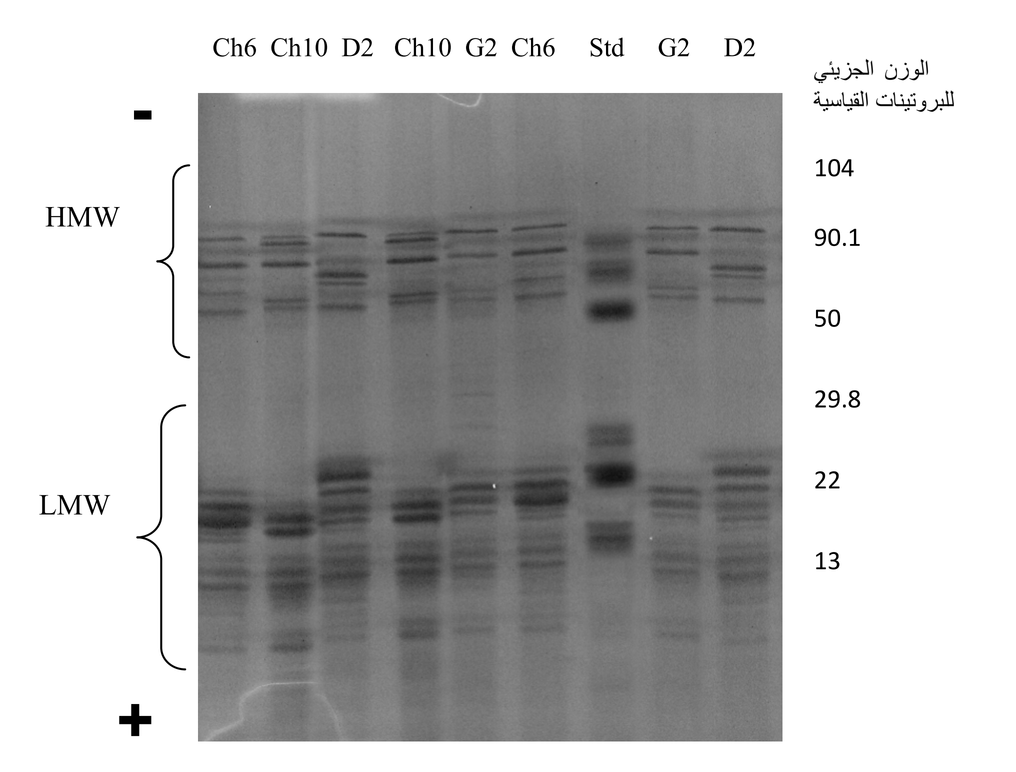


الشكل (١٤): نسبة التشابه والارتباط بين عينتين صنف القمح شام٤ من موسمي (٢٠٠٧، ٢٠٠٨) التي تم تجزئتها على جل الفصل ذاته

٥-٢-٢- تأثير اختلاف سنة النمو على نتائج تجزئة الغلوتينين:

٥-٢-٢-١ نتائج الرحلان الكهربائي:

بعد استخلاص غلوتينين عينات أصناف القمح المدروسة، وتجزئته وفق تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE، دُرس تأثير اختلاف سنة النمو بالاعتماد على الوحدات البروتينية المفصولة بوضوح في منطقة الوحدات البروتينية مرتفعة الوزن الجزيئي HMW ولوحظ من خلال نتائج الفصل تطابق عدد وترتيب العصابات الممثلة لوحدات الغلوتينين المفصولة في عينات الصنف الواحد حتى أن كثافة هذه الوحدات البروتينية كانت متقاربة جداً الشكل (١٥).



الشكل (١٥): تأثير اختلاف سنة النمو على نتائج الرحلان الكهربائي SDS-PAGE عند تجزئة غلوتينين أصناف القمح (دوما٢، جولان٢، شام٦، شام١٠) من موسمي (٢٠٠٧، ٢٠٠٨)

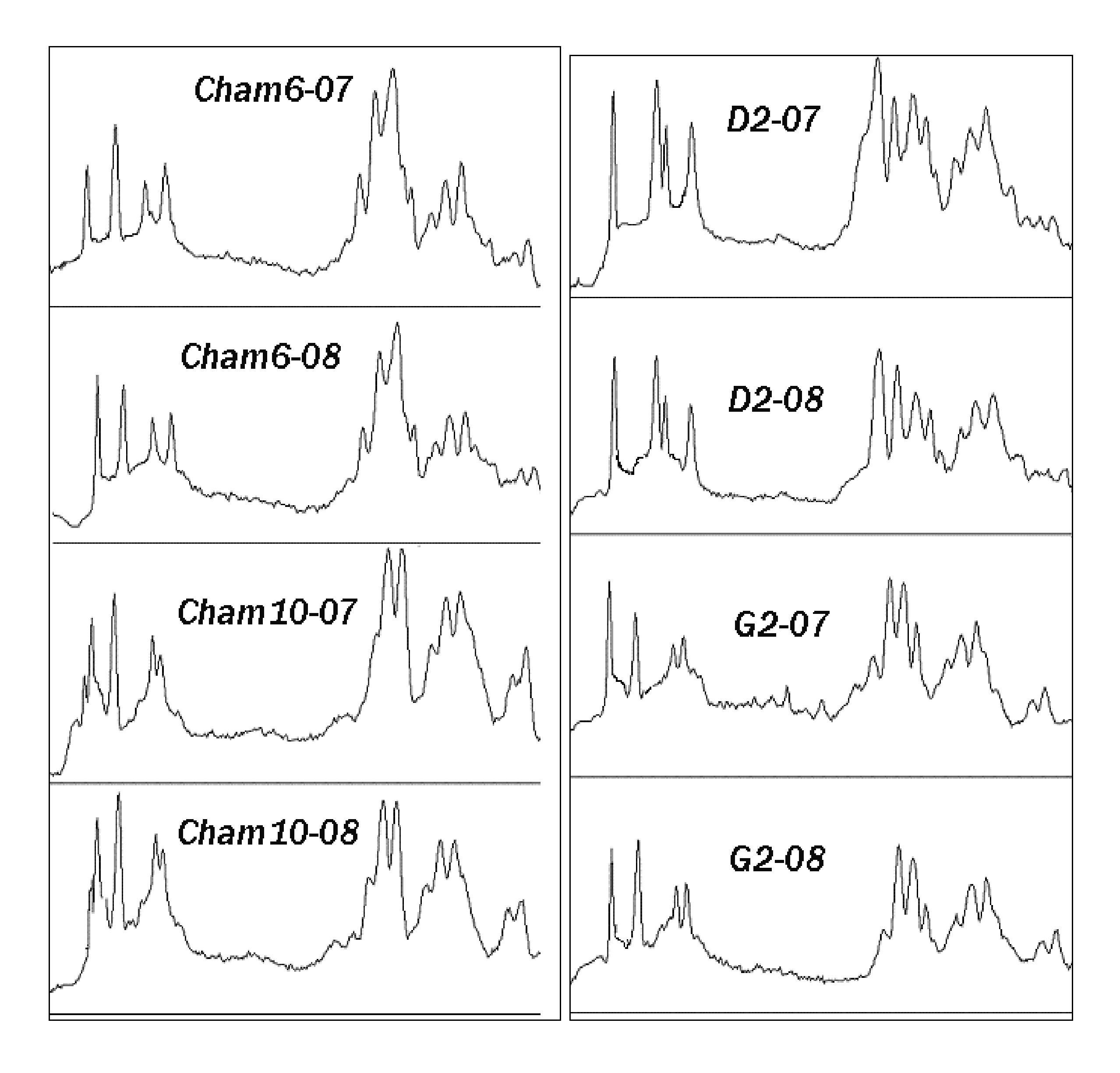
(اختصارات تسمية الأصناف في أعلى صورة الجل Ch:شام، D: دوما، G: جولان، St: بروتين قياسي)

يُلاحظ مثلا" من الشكل (١٥) وجود خمس وحدات بروتينية مرتفعة الوزن الجزيئي في شريطي تجزئة غلوتينين عينات صنف القمح شام١٠ المأخوذة من موسمي نمو (2007,2008) وهي بالترتيب ذاته أيضا"، وهذا يؤكد أن اختلاف موسم النمو لا يؤثر على نتائج تجزئة غلوتينين صنف القمح وهذا يتوافق مع المرجع (Anjum *et al*, 2000).

و يلاحظ هذا التطابق أيضاً لعينات كل من أصناف القمح المدروسة (شام٦، جولان٢، دوما٢) والمأخوذة من الموسمين المدروسين، كما ويلاحظ الاختلاف في عدد وترتيب وحدات الغلوتينين HMW بين أصناف القمح المدروسة ويعتبر هذا مفيداً في مجال تمييز الأنماط الوراثية للأصناف (Mohd *et al*,2007).

٥-٢-٢-٢- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Scion Image:

تؤكد أيضاً المخططات البيانية التي حصلنا عليها من خلال برنامج Scion Image التطابق في ترتيـب وعـدد وكثافة وحدات HMW لعينات صنف القمح الواحد المأخوذة من موسمين مختلفين (الشكل١٦).



الشكل (١٦): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغلوتينين أصناف القمح (شام٦، شام١٠، جولان٢، دوما٢) من موسمي نمو (٢٠٠٧، ٢٠٠٨)

٥-٢-٢-٣-التحليل الإحصائي لنتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج SPSS14

لتحديد أقل فرق معنوي، أخذت عدة عينات من موسمي حصاد (2008-2007) لصنفي القمح شام٦، دوما٢، وتم التحليل الإحصائي ببرنامج SPSS14 لنتائج الرحلان الكهربائي التي بينت ظهور أربع وحدات بروتينية في منطقة الوحدات البروتينية مرتفعة الوزن الجزيئي HMW على شريطي الرحلان الكهربائي لصنفي القمح شام٦، دوما٢ مع اختلاف الحركة النسبية لهذه الوحدات بين الصنفين (الشكل ١٥)، وتؤكد الدراسة الإحصائية بأن اختلاف كثافة الوحدات البروتينية ليس له دلالة إحصائية عند مستوى دلالة 5% وبالتالي فإن اختلاف سنة النمو ليس له تأثير على نتائج تجزئة غلوتينين القمح (الجدول١١).

الجدول(١١): النسبة المئوية لوحدات HMW الظاهرة في مخطط الفصل لعينات صنف القمح دوما٢ (A) وصنف القمح شام٦ (B) من موسمي نمو ٢٠٠٧، ٢٠٠٨

الوحدة البروتينية	موسم 2007	موسم 2008
الأولى	29.33±3.33 a	27.95±1.6 a
الثانية	32.81±5.68 a	35.03±2.97 a
الثالثة	10.73±0.4 a	11.1±0.56 a
الرابعة	27.12±1.75 a	25.93±2.11 a

(B)

الوحدة البروتينية	موسم ٢٠٠٧	موسم ٢٠٠٨
الأولى	19.19±3.27 a	17.39±0.85 a
الثانية	38.28±2.75 a	40.6±0.9 a
الثالثة	6.81±0.92 a	6.98±0.17 a
الرابعة	34.98±1.43 a	35.03±0.22 a

٥-٣- تمييز أصناف القمح المدروسة اعتماداً على نتائج تجزئة الغليادين والغلوتينين:

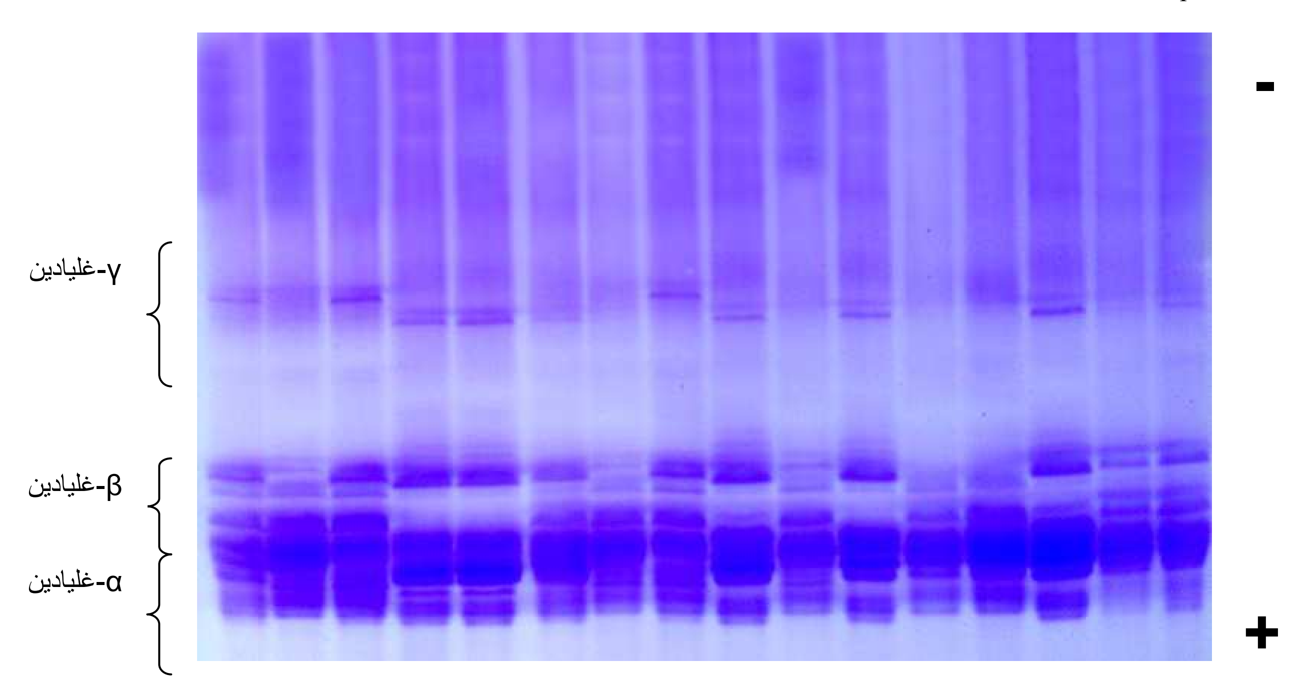
بعد التأكد من ثبات نتائج تحليل غليادين وغلوتينين بعض أصناف القمح المزروعة في سورية وفق تقنية الرحلان الكهربائي وعدم تأثرها باختلاف موقع الزراعة وسنة النمو، وانطلاقاً من الأبحاث التي أشادت بطريقة الرحلان الكربائي وفائدتها في مجال تمييز الأصناف وتحديد هويتها، تم تحليل غليادين وغلوتينين لسبعة عشر صنفاً من أصناف القمح المزروعة في سورية وفق تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE، وتم تحديد الوزن الجزيئي لوحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي التي تظهر واضحة ومفصولة بشكل جيد في مخططات التجزئة. أما بالنسبة لوحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي، نظراً لصعوبة فصلها وفق تقنية الرحلان الكهربائي أحادي البعد فلم يتم تحديد الوزن الجزيئي لكل وحدة منفردة، بل حُدد مجال ظهور هذه الوحدات وتبيّن أن الوزن الجزيئي لهذه الوحدات لا يزيد عن 30KDa.

كما حدد الوزن الجزيئي للوحدات البروتينية التي تظهر في مخططات تجزئة الغليادين في منطقة γ-غليادين فقط إذ تظهر الوحدات البروتينية في هذه المنطقة مفصولة وبشكل واضح على عكس الوحدات البروتينية في منطقتي α- وβ- غليادين التي من الصعب فصلها وفق تقنية الرحلان الكهربائي أحادي البعد وحُدد مجال الأوزان الجزيئية لهذه الوحدات وكان 42-38 كيلودالتون وهذا يتوافق مع ما هو وارد في المراجع (Rashed *et al*., 2007; Bietz and Wall, 1972).

٥-٣-١- تمييز أصناف القمح المدروسة اعتماداً على نتائج تجزئة الغليادين:

٥-٣-١-١- نتائج الرحلان الكهربائي:

بالرغم من عدم ثبات عدد وترتيب الوحدات البروتينية المفصولة في منطقتي α وβ- غليادين لصنف القمح مع تكرار عملية الفصل على أكثر من جل، إلا أن نتائج تجزئة الغليادين تعتبر مفيدة في مجال التمييز بين أصناف القمح عند تجزئتها على جل الفصل ذاته، إذ يلاحظ اختلاف في عدد وترتيب الوحدات البروتينية في مناطق الفصل الثلاث (α و β و γ- غليادين) بين جميع أصناف القمح المدروسة، ولا يمكن أن يُشاهد تطابق كامل لمخططات فصل غليادين أصناف قمح مختلفة.



الشكل(١٧): جل الرحلان الكهربائي لغليادين بعض عينات أصناف القمح المدروسة وصنفي القمح الطري (Opata وPitic)

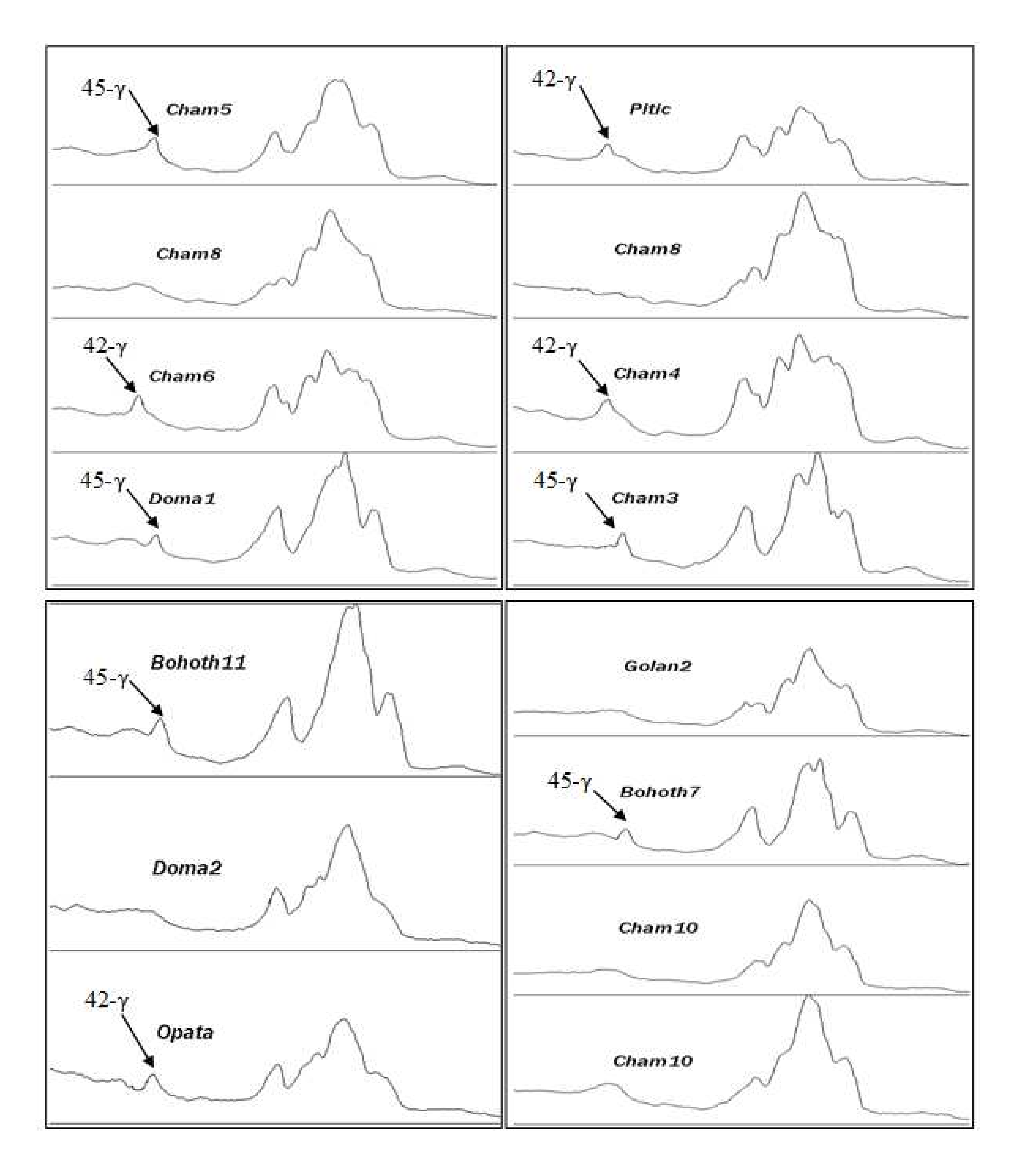
يلاحظ من الشكل السابق ظهور عصابة منفصلة واضحة في منطقة γ–غليادين لجميع أصناف القمح الديورم (شام٣، شام٥، دوما١، بحوث٩، بحوث١١) وتكون الحركة النسبية لهذه العُصابة 45% في حين يُلاحظ وجود عُصابة في منطقة الفصل ذاتها عند حركة نسبية 42% لصنف القمح الطري شام٦، وصنفي القمح Pitic و Opata، ولم يلاحظ وجود أي عُصابة في منطقة γ–غليادين لأصناف القمح الطري (شام٨، جولان٢، دوما٢، شام١٠) وبعد تحديد الوزن الجزيئي للعُصابة البروتينية في منطقة γ–غليادين (وفق ما تم شرحه في فقرة٤–٥ عملي) تبيّن بأن الوزن الجزيئي للعصابة التي تظهر في أصناف القمح الديورم 38KDa~والتي تظهر في بعض أصناف القمح الطري 42KDa~.

إن وجود العصابة γ-45 في أصناف القمح الديورم (شام٣، شام٥، دوما١، بحوث٩، بحوث١١) يدل على مواصفات غلوتين قوية وهذا يتوافق مع ملاءمة هذه الأصناف لصناعة المعكرونة. أما العصابة γ–42 فيدل وجودها على نوعية غلوتين ضعيف (Rashed *et al.*, 2007).

تشكل هاتين العصابتين مؤشر حساس وهام للدلالة عن نوعية الغلوتين وبالتالي الخواص التكنولوجية للخبــز (D'Ovidio and Masci, 2004).

٥-٣-١-٢- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Scion Image:

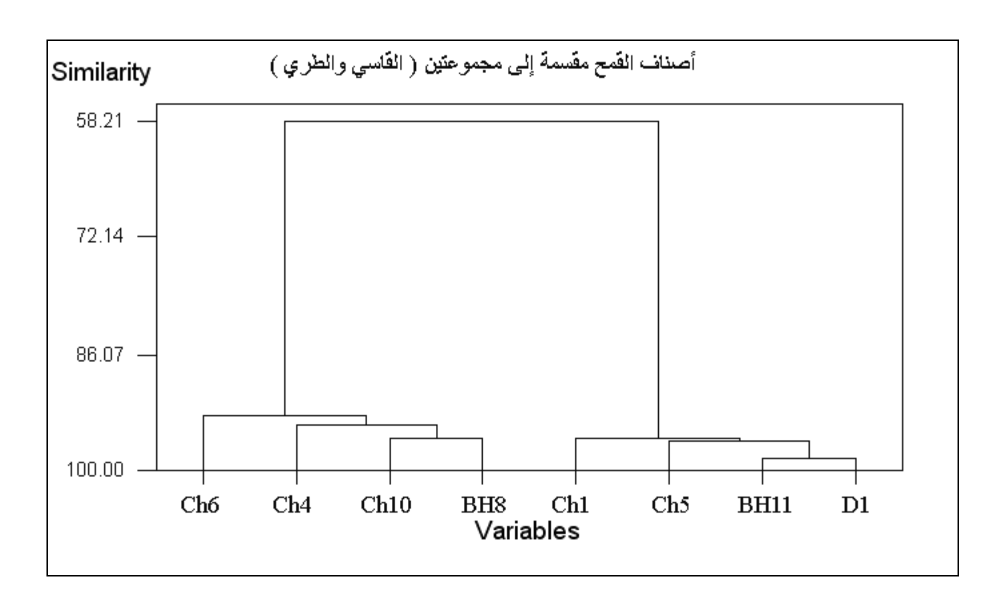
تجعل المخططات البيانية الناتجة عن معالجة شريط الرحلان الكهربائي ببرنـــامج Scion Image عمليـــة المقارنة بين الأصناف أسهل من عملية المقارنة على جل الفصل. يوضـــح الشـــكل (١٨) اخـــتلاف تركيـــب الغليادين بين أصناف القمح المدروسة، وقد استعنا في هذه المرحلة ببعض النتائج الواردة سابقا" أثناء دراســـة بعض المتغيرات على نتائج الرحلان الكهربائي (مثال: شام٥ وشام ١و بحوث٧ و بحوث٨).



الشكل (١٨): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغليادين بعض أصناف القمح المدروسة

٥-٣-١-٣ معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Minitab:

إن دراسة التشابه والارتباط بين أصناف القمح الطري (شام٤، شام٦، شام١٠، بحوث٨) وأصناف القمح الديورم (دوما١ بحوث١١، شام١ ، شام٥) بينت انخفاض نسبة التشابه للأصناف من نوعين مختلفين (طري وديورم) إلى 58%~وترتفع هذه النسبة لتصل 93%~ للأصناف ضمن النوع الواحد.



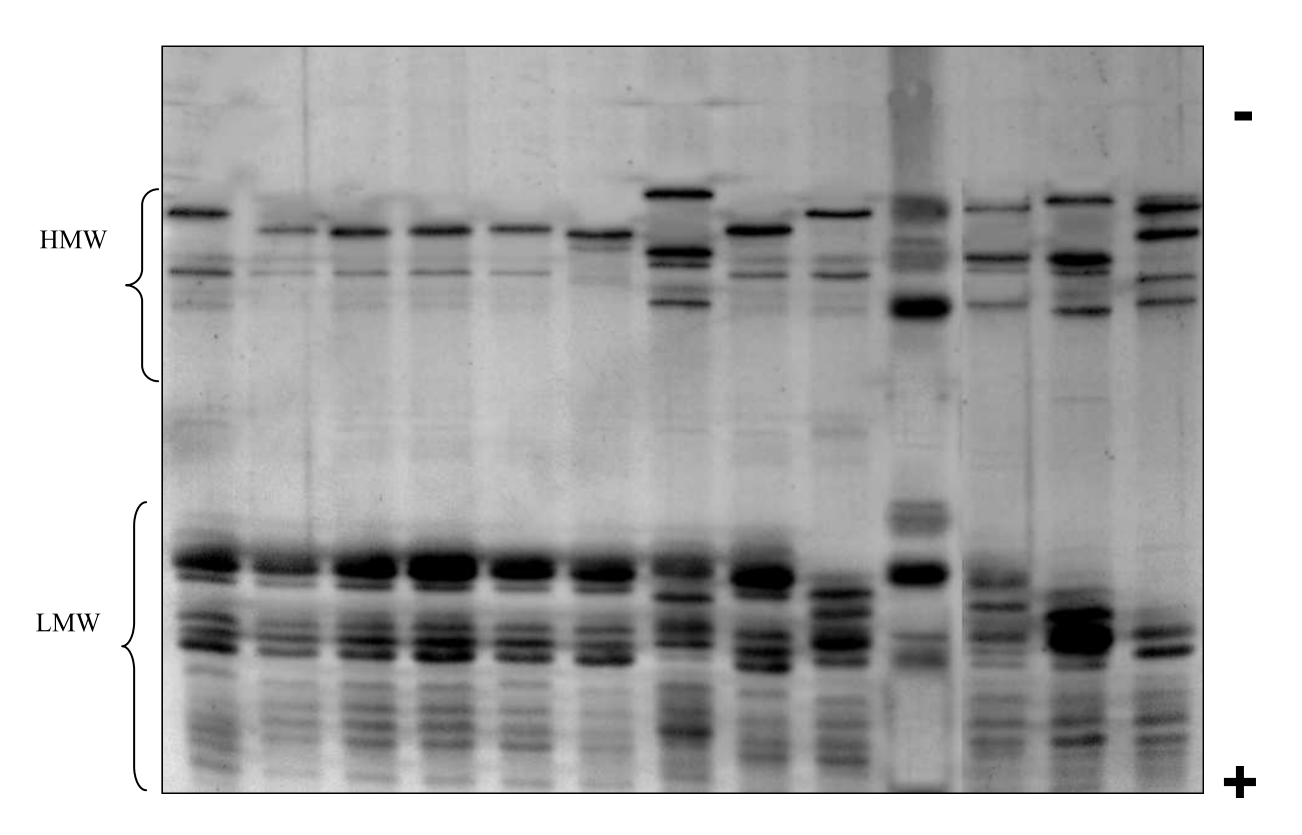
الشكل (١٩): نسبة التشابه والارتباط بين أصناف القمح المدروسة (شام٦، شام٤، شام١٠، شام٥، شام١، بحوث١١، بحوث٨، دوما١) والتي تمت تجزئتها على جل الفصل ذاته

٥-٣-٢- تمييز أصناف القمح المدروسة اعتماداً على نتائج تجزئة الغلوتينين:

٥-٣-٢-١ نتائج الرحلان الكهربائي:

على خلاف مخططات تجزئة الغليادين، تظهر وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي منفصلة وبشكل واضح وهي تختلف من حيث عددها وترتيبها على جل الفصل، وقد تم من خلال مخططات تجزئة غلوتينين أصناف القمح المدروسة تمييز 13 وحدة بروتينية في منطقة وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي، يمكن أن يظهر منها في كل صنف (2, 3, 4, 5)، حيث لوحظ وجود عصابتين في منطقة HMW لأصناف القمح الديورم، 5 ,4 ,3 وحدات HMW لأصناف القمح الطري، ويأتي هذا متفقاً مع ما ذُكر في أبحاث سابقة

(Branlard *et al*., 1989; Lawrence and Shepherd, 1980; Payne, *et al*.1980) وبالاعتماد على هذه الوحدات تم تمييز تسع نماذج تندرج تحتها أصناف القمح المدروسة.



الشكل (٢٠): جل الرحلان الكهربائي لغلوتينين أصناف القمح بعض أصناف القمح المدروسة.

من الشكل (٢٠) يلاحظ عدم وجود اختلاف في ترتيب وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي لأصناف القمح الديورم (بحوث٧، بحوث٥، دوما١) وهذا يدل على عدم وجود اختلاف وراثي عريض بين هذه الأصناف، إذ يلاحظ في مخططات تجزئة غلوتينين هذه الأصناف ظهور عُصابتين الأولى عند مسافة الهجرة 25.75% والثانية عند 29.6% وقد يكون هذا التشابه ناتج عن اشتراك الأصناف بأحد الأبوين.

حُددت الأوزان الجزيئية للوحدات البروتينية بالاعتماد على مجموعة البروتينات العيارية، وحصلنا بالنتيجة على الجدول (١٢) الذي يوضح الأوزان الجزيئية لوحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي التي ظهرت في مخططات تجزئة غلوتينين أصناف القمح المختلفة.

الجدول(١٢):**الوزن الجزيئي للوحدات البروتينية (HMW) الظاهرة في مخططات تجزئة الغلوتينين لأصناف القمح المدروسة مع مسافة الهجرة المقابلة لكل منها**

الحركة النسبية%	20.9	21	23	23.5	25.75	25.9	26.5
الوزن الجزيئيKDa	116	115	106	103	93.5	92.5	90
الحركة النسبية%	20.9	21	23	23.5	25.75	25.9	26.5
الوزن الجزيئيKDa	86	81	78.5	74	70.5	68.5	

٥-٣-٢-٢- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Scion Image:

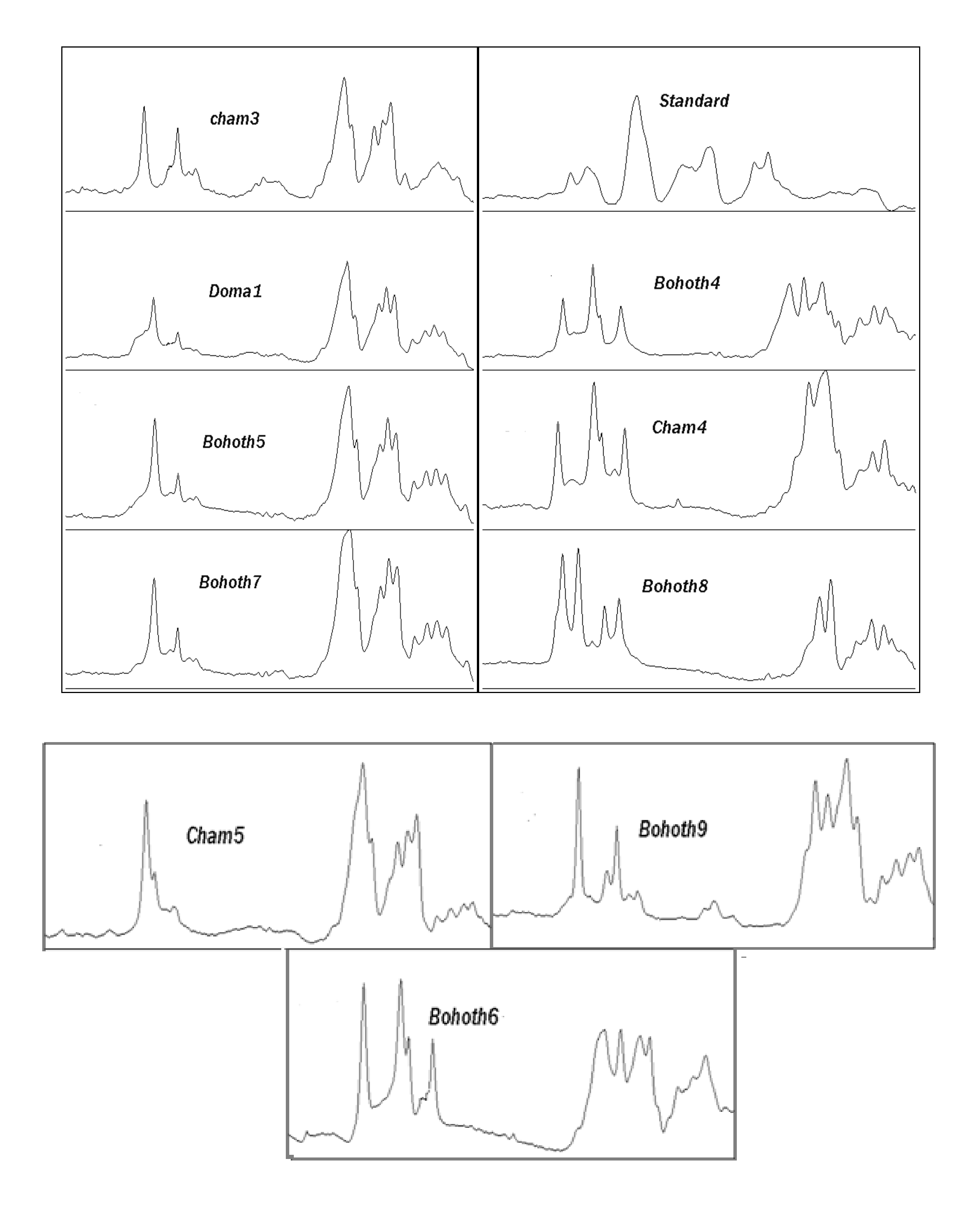
تؤكد المخططات الناتجة وفق برنامج Scion Image (الشكل ٢١) على تشابه أصناف القمح الديورم (بحوث٧، بحوث٥، دوما١) بعدد وترتيب وحدات HMW واختلاف عدد وترتيب هذه الوحدات في مخططات بقية الأصناف المدروسة.

٥-٣-٢-٣- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Minitab:

لحساب نسبة التشابه والاختلاف بين الأصناف، تم إعداد جدول لجميع الوحدات البروتينية مرتفعة الوزن الجزيئي التي يمكن أن تظهر في أصناف القمح المدروسة، وحددت نسبة التشابه بين الأصناف على أساس وجود وغياب الوحدات البروتينية في مخططات تجزئة الغلوتينين.

يلاحظ من خلال (الجدول ١٣)وجود تطابق في ترتيب الوحدات البروتينية لبعض أصناف القمح (شام١، بحوث٥ بحوث٧، دوما١)، (شام٤، دوما٢، بحوث٦)، (شام١٠، شام٨، بحوث٨)، (شام٣، بحوث٩)، ولحساب نسبة التشابه بين هذه المجموعات فيما بينها والأصناف الخمس المتبقية، تم استخدام برنامج Minitab فحصلنا على المخطط الموضح في الشكل (٢٢).

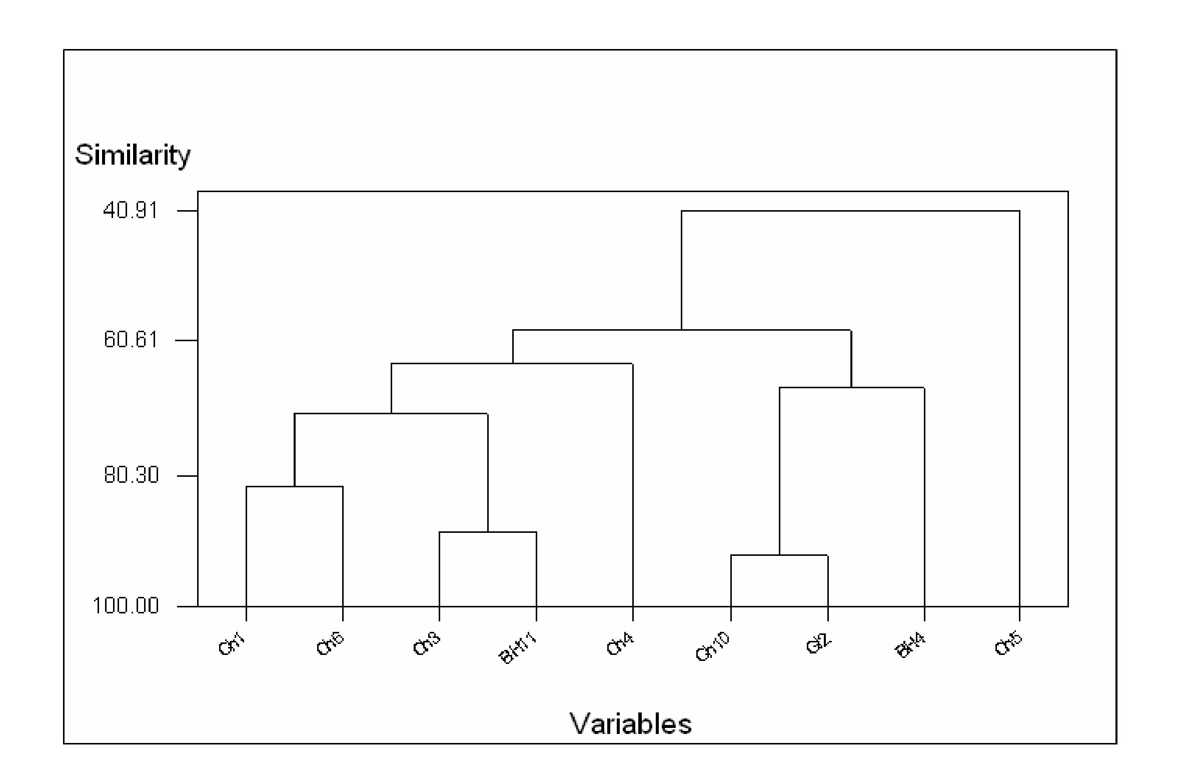
ملاحظة: بما أن التشابه تام ما بين أصناف المجموعات الأربعة المذكورة سابقاً، لذلك سنختار صنف واحد من كل مجموعة لدراسة نسبة التشابه مع الأصناف البقية، والنتائج تنطبق بالتالي على كل أصناف المجموعة.



الشكل (٢١): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغلوتينين أصناف القمح المدروسة

الجدول(١٣) : وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي (HMW) التي تظهر في أصناف القمح المدروسة

صنف القمح	وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW بحسب حركتها النسبية على الجل(%)												
	20.9	**21**	**23**	**23.5**	**25.7**	**25.9**	**26.5**	**27.4**	**29**	**29.6**	**31**	**32.1**	**32.7**
Cham 1					1					1			
Cham 3				1						1			
Cham 5						1	1						
Bohoth 5					1					1			
Bohoth 7					1					1			
Bohoth 9				1						1			
Bohoth11				1						1			1
Doma 1					1					1			
Cham 4		1						1	1				1
Cham 6		1			1					1			1
Cham 8	1		1		1						1	1	
Cham 10	1		1		1						1	1	
Bohoth 4	1		1					1	1			1	
Bohoth 6		1						1	1				1
Bohoth 8	1		1		1						1	1	
Doma 2		1						1	1				1
Golan 2	1				1						1	1	



الشكل (٢٢): معامل التشابه والاختلاف بين أصناف القمح الديورم والطري المدروسة

يلاحظ أن أعلى نسبة تشابه كانت بين صنفي القمح (شام١٠ و جولان٢) وهي 92%~ ، بينما تقل نسبة التشابه لتكون 89%~ بالنسبة لصنفي القمح (شام٣، بحوث١١)، و82% للصنفين (شام١، شام٦)، وتكون نسبة التشابه بين هاتين المجموعتين (شام٣، بحوث١١) و(شام١، شام٦) 71%~وتنخفض هذه النسبة تدريجياً لتكون في النهاية بين صنف القمح شام٥ وبقية الأصناف 41% وهذا الاختلاف يؤكد على إمكانية الاعتماد على تجزئة الغلوتينين في التمييز بين أصناف القمح المدروسة.

٥-٤- تحديد هوية أصناف القمح من خلال مخططات تجزئة البروتينات التخزينية

٥-٤-١- تحديد هوية أصناف القمح من خلال مخططات تجزئة الغليادين:

٥-٤-١-١- نتائج الرحلان الكهربائي:

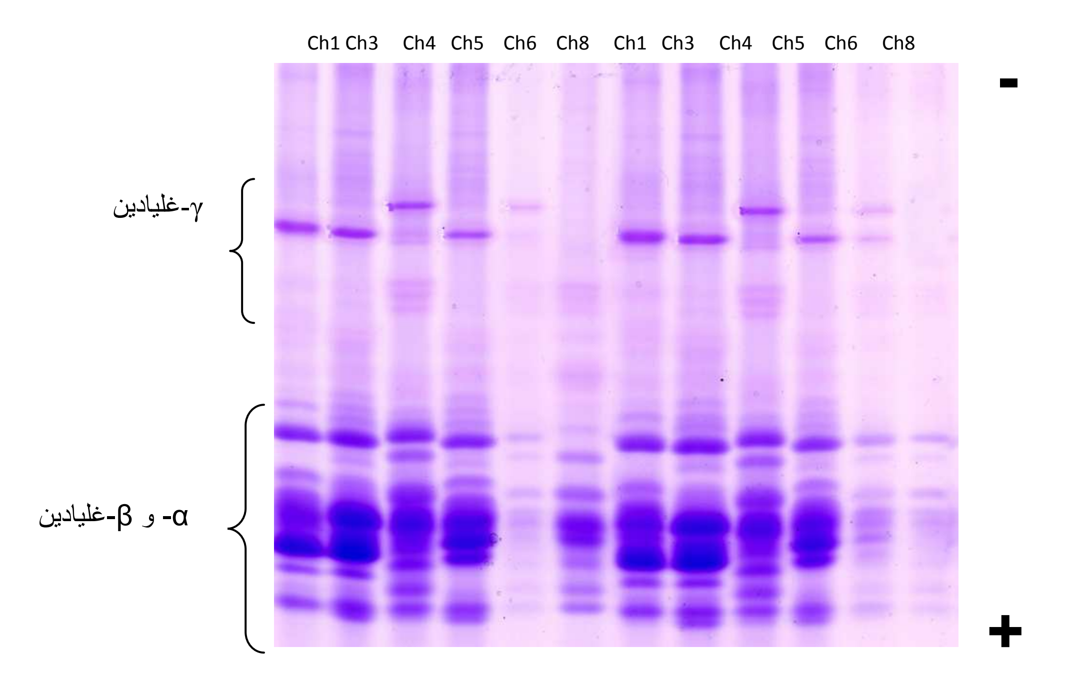
بما أن ترتيب الوحدات البروتينية الظاهرة في منطقتي γ و β- غليادين يختلف مع تكرار التجربة، فلا يمكن تحديد هوية صنف القمح بالاعتماد على الوحدات البروتينية الظاهرة في هاتين المنطقتين، إنما يمكن فقط من خلال وجود أو غياب العُصابة γ-45 تحديد نوعية القمح. إذ يبين الشكل (٢٣) أنه من السهل جداً تحديد نوع

القمح وذلك من خلال العُصابة γ-45 التي تظهر في أصناف القمح من النوع الـديورم فقـط، وتغيـب عـن مخططات أصناف القمح الطري.وهذا يأتي متفقاً مع نتائج (Payne *et al*., 1984)

ولتحديد هوية صنف قمح جديد غير معتمد يمكننا أولاً تحديد نوعه بالاعتماد على العُصابة γ- 45، ومن ثـم تجزئته وفق تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE إلى جانب مجموعة من الأصناف المعتمدة من النوع ذاته، وتحديد نسبة التشابه والارتباط مع تلك الأصناف.

تجدر الإشارة إلى أن نتائج تجزئة الغليادين ثابتة عند ظروف التجربة الواحدة، وهذا ما تم تأكيده عند تجزئـة مستخلص الغليادين لعدة حبات مفردة على جل فصل واحد، حيث يلاحظ التطابق في عدد وترتيب الوحـدات البروتينية، إنمّا قد يُلاحظ بعض الاختلاف في الكثافة اللونية لهذه الوحدات، وهذا يـرتبط بنسـبة الغليـادين المستخلص ونسبة وجوده في الحبة ولايتعلق بنوعية الغليادين الشكل (٢٣).

عند ترتيب تحت الوحدات البروتينية الناتجة عن تجزئة غليادين أصناف القمح المدروسة على أساس حركتهـا النسبية، يمكن أن نميز 9 تحت وحدات يظهر منها 8 ,7 ,6 وحدات في مخططات الصنف الواحد وهذا يـرتبط بعوامل وراثية تخص الصنف بصنف، فمثلاً عند تجزئة مستخلص الغليادين لعينات صنف القمح شام١ يُلاحظ ظهور ست تحت وحدات بروتينية، خمس منها في منطقتي الفصل α- و β- غليادين وواحدة في المنطقـة γ- غليادين (γ-45). وتكون كثافة العُصابات المتقابلة على شريطي الرحلان الكهربائي لعينتـي هـذا الصـنف مُتقاربة جداً وهذا ما تُؤكده المخططات الناتجة عن برنامج Scion Image (الشكل٢٤)، والأمر ذاتـه ينطبـق على بقية الأصناف المذكورة سابقاً، عدا صنف القمح شام٨ فيُلاحظ اختلاف واضح فـي كثافـة العُصـابات المتقابلة.

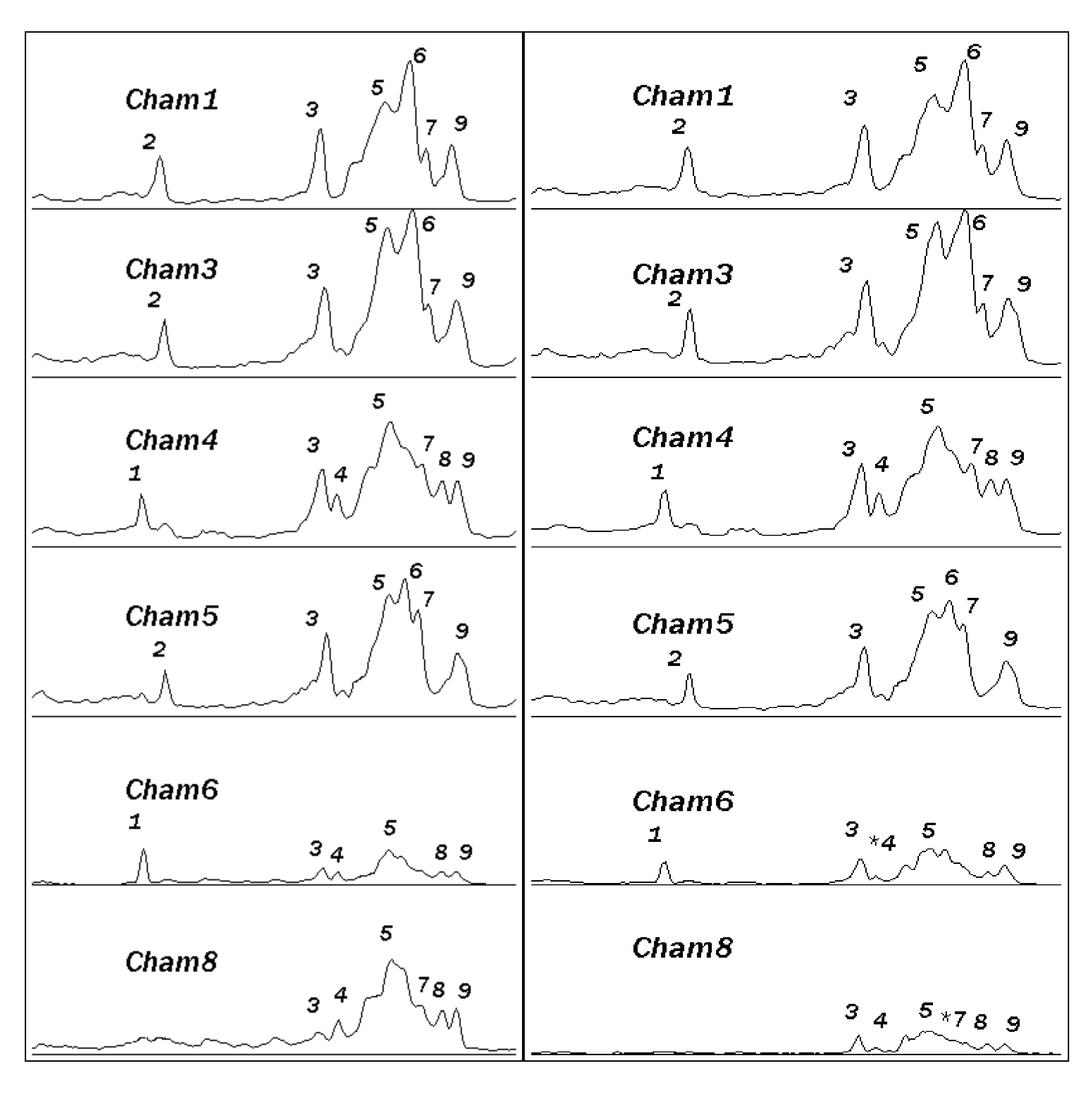


الشكل(٢٣): جل الرحلان الكهربائي لغليادين حبات مفردة لبعض أصناف القمح المدروسة

(الاختصار **Ch**: شام)

٥-٤-١-٢- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Scion Image:

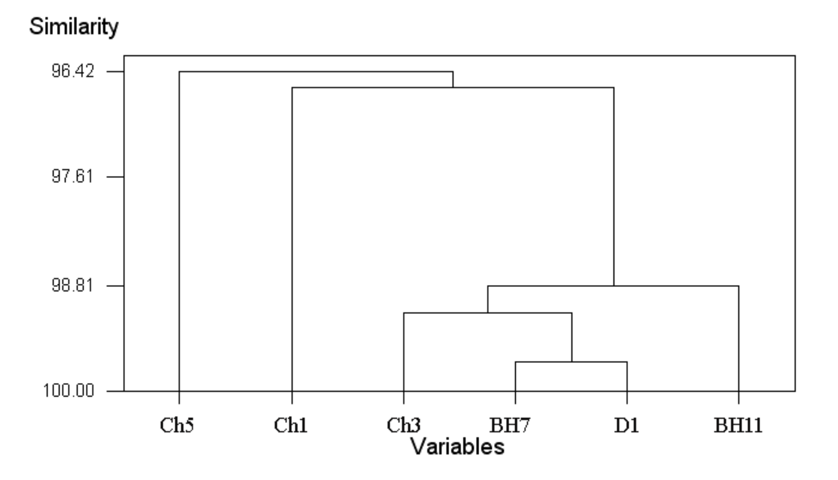
عند تمييز أصناف القمح ضمن النوع الطري يُلاحظ غياب العُصابة γ-42 في نتائج تحليل عينات القمح من الصنف شام٨ في حين توجد في نتائج تحليل غليادين صنفي القمح شام٤ وشام٦ والاختلاف بين نتائج تحليل عينات الصنفين الأخيرين، يكون من خلال العُصابة ٧ التي تظهر في نتائج تحليل صنف القمح شام٤ ولا تظهر مع صنف القمح شام٦ . أما أصناف القمح الديورم فيكون الاختلاف بينها فقط في كثافة العُصابة الخامسة الشكل (٢٤).



الشكل (٢٤): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغليادين بعض أصناف القمح المدروسة (تم استخلاص الغليادين من حبة واحدة مفردة من كل صنف وأرقام القمم تتوافق مع ترتيب ظهور العصابات على جل الفصل)

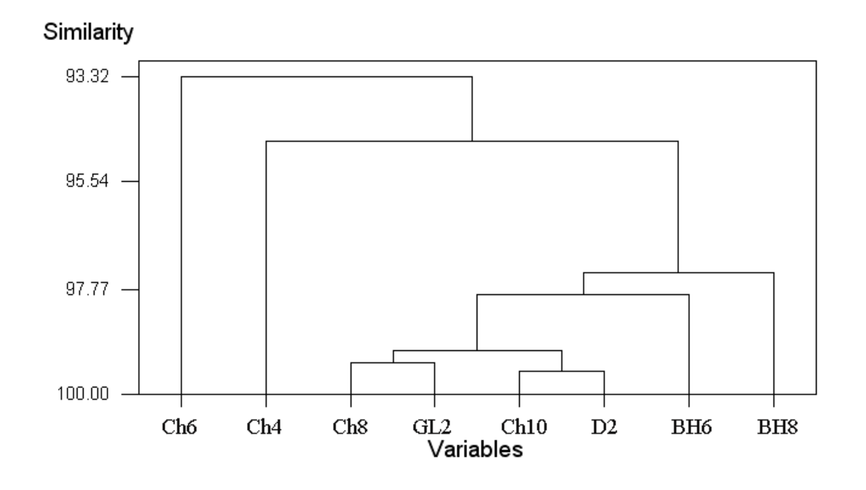
٥-١-٢-٢- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Minitab:

تبين النتائج المبينة في الأشكال (٢٥، ٢٦) ارتفاع نسبة التشابه بين أصناف القمح من النوع الطري كان أم ديورم وهذا لا يسمح بالاعتماد على نتائج تجزئة الغليادين لتحديد هوية صنف القمح.



الشكل(٢٥): معامل التشابه والارتباط بين أصناف القمح الديورم المدروسة (شام-٥، شام-١، شام-٣، بحوث-٧، دوما ١، بحوث ١١) وفق برنامج Minitab

(تشير الرمز **Ch** إلى الصنف شام، **BH** إلى الصنف بحوث، **D** إلى الصنف دوما)



الشكل(٢٦): معامل التشابه والارتباط بين أصناف القمح الطري المدروسة (شام-٦، شام-٤ شام-٨، جولان-٢، شام-١٠، دوما-٢، بحوث -٦، بحوث-٨) وفق برنامج Minitab

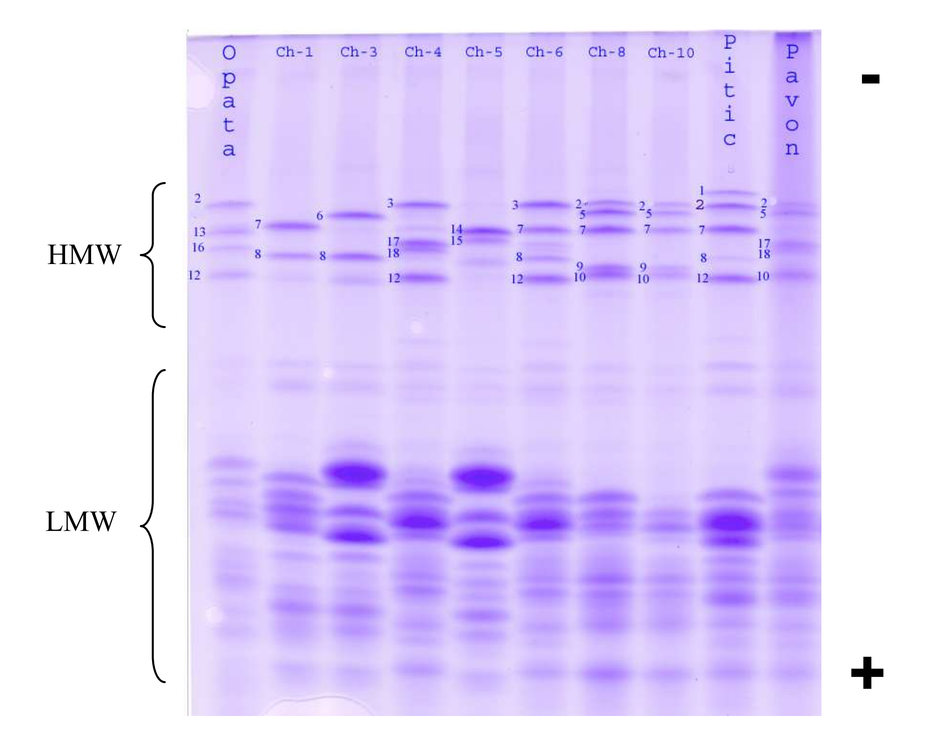
(الرمز **Ch** إلى الصنف شام، **BH** إلى الصنف بحوث، **D** إلى الصنف دوما، **GL** إلى جولان)

٥-٤-٢- تحديد هوية أصناف القمح المدروسة اعتماداً على نتائج تجزئة الغلوتينين:

٥-٤-٢-١- نتائج الرحلان الكهربائي:

عند تجزئة غلوتينين أصناف القمح المدروسة وفق تقنية الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE) لوحظ اختلاف عدد وترتيب وحدات الغلوتينين HMW بين الأصناف، ومع تكرار التجربة لم يتغير عدد هذه الوحدات لعينات الصنف الواحد وكان الاختلاف في حركتها النسبية (%0.25-0.5~)، لذلك فإن وحدات HMW تعتبر مفيدة

لتحديد هوية الأصناف والتمييز بينها. تم ترقيم هذه الوحدات البروتينية وفق نظام الترقيم المعتمد في المراجع (Payne and Lawrence, 1983; Payne *et al*, 1987)، ولأجل ذلك استخدمنا ثلاث أصناف قمح قياسية (Pitic, Pavon, Opata، وهي أقماح ميكسيكية من نوع الطري) تضم معظم الوحدات البروتينية التي يمكن أن تظهر في أصناف القمح المدروسة وقد تم ترقيم الوحدات الإضافية بالاعتماد على دراسات سابقة (Burnouf and Bouriquet, 2004).



الشكل(٢٧): جل الرحلان الكهربائي لغلوتينين بعض عينات أصناف القمح المدروسة تظهر فيها وحدات HMW مرقمة بحسب نظام الترقيم (Payne and Lawrence, 1983; Payne, 1987)

يُلاحظ من الشكل (٢٧) أن غلوتينين صنف القمح الديورم شام١ يحوي على العُصابتين ٧ و٨ بينما تظهر العُصابتين 6, 8 لصنف القمح شام٣، والعصابتين14, 15 في نتائج تجزئة غلوتينين صنف القمح شام٥، وعليه لا يُلاحظ تشابه بين الأصناف بحسب نتائج تجزئة غلوتينين هذه الأصناف وفق تقنية SDS-PAGE في حين كانت نسبة التشابه بين هذه الأصناف بحسب نتائج تجزئة الغليادين 95%~، لذلك تعتبر وحدات HMW أكثر كفاءة على تحديد هوية الأصناف والتمييز فيما بينها، وتبقى نتائج تجزئة الغليادين مفيدة في تحديد نوع القمح (طري أم ديورم).

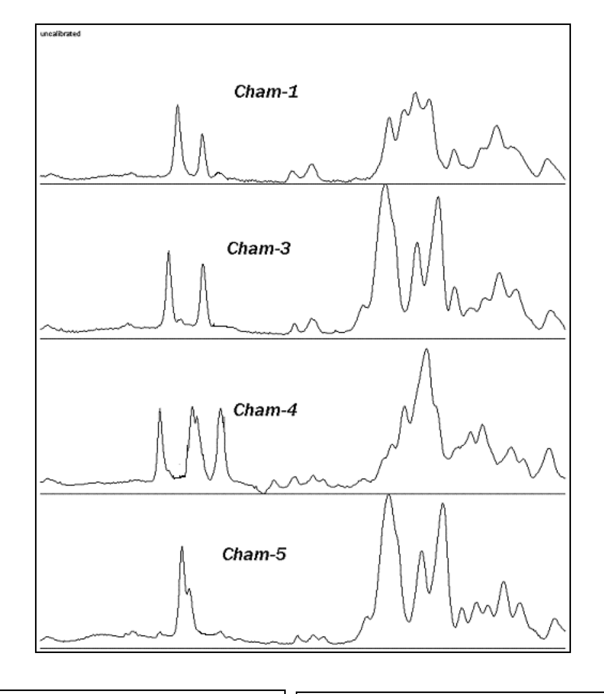
ونورد في الجدول(١٤) ملخصا" عن أصناف القمح المدروسة ووحدات الغلوتينين مرتفعة الــوزن الجزيئــي HMW الظاهرة في جل الرحلان الكهربائي الخاص بها، وقد حاولنا الربط بين وجود هــذه الوحــدات وبــين نوعية غلوتين الأصناف المدروسة. لقد اعتمدنا على نتائج أبحاث سابقة (Masouleh, 2005; Mohd, 2007) تم فيها تحديد نوعية الغلوتين وفقا" لوجود بعض وحدات الغلوتينين HMW.

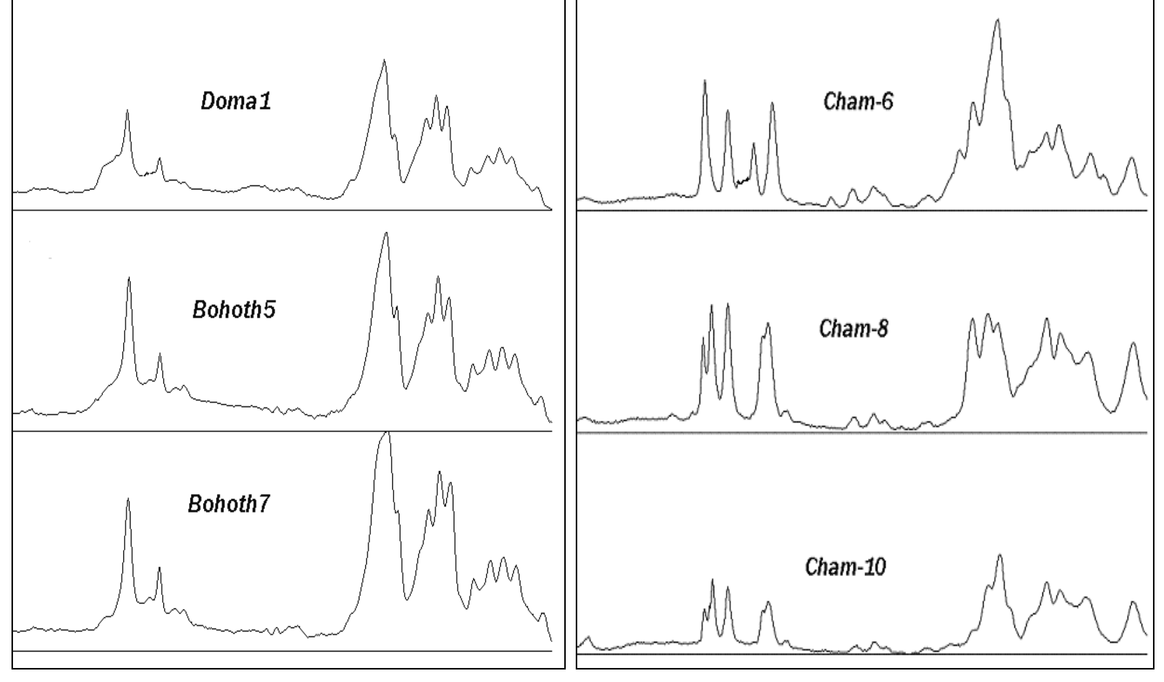
الجدول (١٤): هوية أصناف القمح المدروسة ونوعية الغلوتين بحسب وحدات الغلوتينين HMW

صنف القمح	وحدات الغلوتينين HMW	نوع الغلوتين
شام٨، شام١٠، بحوث٨	2, 5, 7, 9, 10	قوي
شام١، بحــوث٥، بحــوث٧، دوما١	7, 8	جيد
شام٤، بحوث٦، دوما٢	2, 17, 18, 12	جيد
شام٣، بحوث٩	6, 8	ضعيف
شام٦	3, 7, 8, 12	جيد
بحوث٤	2, 5, 17, 18 10	قوي
جولان ٢	2, 7, 9, 10	مقبول
بحوث١١	6, 8, 12	ضعيف
شام٥	14,15	-

٥-٤-٢-٢- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Scion Image

تميز مخططات Scion Image هوية أصناف القمح المدروسة من خلا ل مجموعة من القمــم المميــزة لكــل صنف، ويتضح تطابق ظهور الوحدات البروتينية لأصناف (شام١، بحوث٥، بحوث٧، دوما١) وأيضاً (شام٨، شام١٠) الشكل (٢٨).

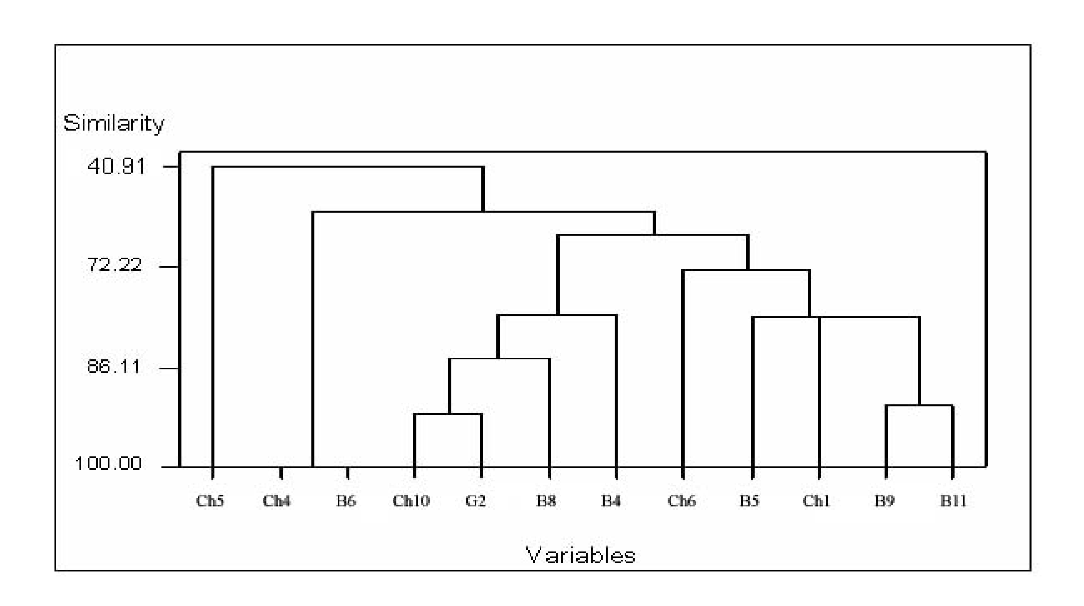




الشكل(٢٨): نتائج معالجة جل الرحلان الكهربائي وفق برنامج Scion Image لغلوتينين بعض أصناف القمح المدروسة

٥-٤-٢-٣- معالجة نتائج الرحلان الكهربائي ببرنامج Minitab :

سيتم عرض صنف واحد من كل مجموعة من الأصناف المتطابقة على مخطط التشابه والارتباط وذلك لأن عدد الأصناف التي يمكن أن يحدد نسبة التشابه والارتباط بينها وفق برنامج Minitab يكون مساو لعدد المتغيرات (وحدات HMW) التي عددها 13 ناقص واحد وبالتالي يمكن عرض نسبة التشابه والارتباط بين 12 صنف قمح مدروس الشكل (٢٩).



الشكل(٢٩): معامل التشابه والاختلاف بين أصناف القمح المدروسة وفق برنامج Minitab

حُسبت نسبة التشابه في المخطط السابق وفق برنامج Minitab وبالاعتماد على النسبة المئوية لوحدات HMW وعلى وجود وغياب العُصابتين (γ-45، γ-42)، ويلاحظ وجود تطابق تام لصنفي القمح شام٤ وبحوث٦، وتكون نسبة التشابه 93%~ بين صنفي القمح جولان٢، شام١٠، و90%~ بين صنفي القمح بحوث٩ وبحوث١١، وتنخفض نسبة التشابه بين الأصناف تدريجياً لتكون 41%~ بين صنف القمح شام٥ وبقية الأصناف المدروسة.

٦- الاستنتـــــاجات:

إنّ تجزئة البروتينات التخزينية وفق تقنية الرحلان الكهربائي اختبار معتمد في العديد من بلدان العالم في مجال تحديد هوية أصناف القمح، وعلى المستوى المحلي تعتبر هذه الدراسة من المحاولات الأولى التي قامت بهدف تحديد مدى ملائمة هذه الطريقة لتمييز أصناف القمح المزروعة في سورية وتحديد هويتها، بغية اقتراحها لاعتمادها كطريقة تصنيفية جديدة. وقد أعطت هذه الدراسة نتائج هامة في مجال تمييز أصناف القمح المنتشرة في سورية وتحديد هويتها.

ومن نتائج هذه الدراسة نخلص إلى ما يلي:

١. سمح برنامج Scion Image في تحديد النسبة المئوية للوحدات البروتينية وهذا أفضـــل مـــن نظـــام الترقيم المعتمد في بعض المراجع (Jones *et al.*,1979) والذي يعطي العصـــابات أرقامـــا" مـــن 1 وحتى 5 تبعا" للكثافة اللونية للعصابات على جل الفصل. بالإضافة لذلك يسمح هذا البرنامج بالتحديـــد الكمي وبالتالي بإجراء الدراسات الإحصائية لتحديد تأثير العوامـــل المختلفـــة علـــى نتـــائج تجزئـــة الغلوتينين، وتحديد نسبة التشابه والارتباط بين الأصناف.

٢. لم تتأثر وحدات الغليادين المفصولة وفق تقنية SDS-PAGE بتغير موقع زراعة صنف القمح، حيـــث تظهر العُصابات البروتينية على شريط الرحلان الكهربائي لكل صنف من أصناف القمح المدروســـة المزروعة في منطقة ما، مطابقة لمقابلاتها من الصنف ذاته والمزروع في المناطق الأخرى. وكـــذلك بالنسبة لوحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW فهي لا تتأثر بتغير موقع النمو وتظهر نتائج تجزئة الغلوتينين لعينات صنف القمح الواحد المزروع في ثلاث مواقع جغرافية متطابقة.

٣. تبيّن عند دراسة تأثير اختلاف سنة المحصول على نتائج تجزئة البروتينات التخزينية، أن هذا العامل لم يؤدي لاختلاف في عدد وترتيب وحدات الغليادين والغلوتينين لعينات أصناف القمـــح المدروســـة والمأخوذة من موسمين مختلفين (2008-2007).

٤. تبين وبالاعتماد على نتائج تجزئة الغليادين انخفاض نسبة التشابه والارتباط بين أصناف القمح من نوعين مختلفين (طري وديورم)، وارتفاعها للأصناف ضمن النوع الواحد.

٥. تبيّن أنه من الصعب الاعتماد على مخططات تجزئة الغليادين في تحديد هوية صنف القمح نظراً لعدم إمكانية الفصل الجيد للوحدات البروتينية في منطقتي الفصل α- وβ-غليادين وفق تقنية الرحلان الكهربائي أحادي البعد، بالإضافة لارتفاع نسبة التشابه بين أصناف القمح من النوع الواحد الطري أم الديورم.

٦. يمكن تحديد نوع القمح (ديورم أم طري) اعتماداً على العُصابة γ-45 التي تظهر عند تجزئة غليادين صنف القمح الديورم، فوجود هذه العُصابة يدل على أن صنف القمح هو من النوع الديورم وعدم وجودها يعني أن صنف القمح هو من النوع الطري.

٧. يبلغ مجموع وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW التي تظهر عند تجزئة غلوتينين أصناف القمح المدروسة 13 وحدة بروتينية، ويمكن أن يضم كل صنف قمح (2, 3, 4, 5وحدات) وهذا يتعلق بعوامل وراثية تعود للصنف، ويعتبر هذا مفيداً في مجال تحديد هوية أصناف القمح وتحديد نسبة التشابه والارتباط بين الأصناف.

٨. تم تمييز 9 نماذج لوحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW تتدرج تحتها الأصناف المدروسة وعددها سبعة عشر صنفاً.

٩. تعد وحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي HMW أكثر أهمية من وحدات الغليادين لتمييز أصناف القمح وفق تقنية SDS-PAGE ، وهذا ما تؤكده نتائج تجزئة البروتينات التخزينية لصنف القمح شام٥، حيث كانت نسبة التشابه مع أصناف القمح شام١ وشام٣، 95% وذلك بحسب نتائج تجزئة الغليادين، في حين بلغت 58% فقط بحسب نتائج تجزئة الغلوتينين. ، وتبقى نتائج تجزئة الغليادين مفيدة في تحديد نوع القمح (ديورم أم طري).

١٠. لم يُلاحظ اختلاف واسع في مخططات فصل البروتينات التخزينية لأصناف القمح الديورم وهذا يــدل على اختلاف وراثي بسيط بين أصناف القمح الديورم المزروعة في سو

٧-المقترحات:

١. إن تغيّر الخواص الشكلية لحبة القمح وتأثرها بالظروف البيئية يسبب الكثير من الإرباك للخبراء في مجال تصنيف الحبوب، لذلك لابد من إيجاد البديل لهذه الطريقة التقليدية المعتمدة في مجال تصنيف القمح السوري، وعليه يُقترح تعزيز التعاون مع المراكز البحثية المنتشرة في سورية والمعنية بتطوير زراعة القمح وتحديد مدى دقة ما تم التوصل من نتائج بهدف إعداد تصنيف جديد للقمح السوري بالاعتماد على طريقة الرحلان الكهربائي التي تعطي نتائج ثابتة تحمل مدلول وراثي ومستقلة عن تأثيرات الظروف البيئية.

٢. يتم تحديد نوعية الغلوتين من خلال وحدات الغليادين ووحدات الغلوتينين مرتفعة الوزن الجزيئي وتلعب هذه الوحدات دوراً رئيسياً في تحديد الخواص الريولوجية للعجين ونوعية منتجات القمح، وانطلاقاً من ذلك يُقترح تحديد الوحدات البروتينية المسؤولة عن المواصفات الجيدة للخبز العربي، وتحديد المورثات المسؤولة عن هذه الوحدات البروتينية كي نحصل من خلال برامج تربية القمح على أصناف مناسبة للصناعات المحلية.

٣. إجراء اختبارات خاصة لتحديد نوعية غلوتين كل صنف من الأصناف المدروسة (الاكستنسوغراف، الفارينوغراف، اختبار زيلني،...) وربط هذه النتائج مع ما تم التوصل إليه في هذا البحث لتحديد عصابات الغلوتينين HMW المسؤولة عن نوعية الغلوتين في القمح السوري.

٤. تعتبر سورية مركز وراثي رئيسي للقمح، وأصنافها البرية مصدر تنوع وراثي هام يمكن أن يستخدم في برامج تربية القمح لتحسين أصناف القمح، ويعتبر من المفيد استخدام طريقة الرحلان الكهربائي لتحديد بعض الصفات الوراثية للأصناف البرية الموجودة.

٥. دراسة إمكانية استخدام تقنية الرحلان الكهربائي ثنائي البعد في تحديد هوية أصناف القمح من خلال نتائج تجزئة البروتينات التخزينية وذلك نظراً لارتفاع كفاءة هذه التقنية في فصل وحدات الغلوتينين منخفضة الوزن الجزيئي (LMW) ووحدات الغليادين في منطقتي الفصل α و β- غليادين.

المراجع العربية

١- حسين كمال رشدي فؤاد -٢٠٠٣- **كيمياء الحبوب ومنتجاتها** - كلية الزراعة - جامعة عين شمس.

٢- الصالح عبود علاوي -١٩٩٦- **تكنولوجيا الحبوب** -كلية الزراعة- جامعة حلب

٣- عليا تميم -٢٠٠٠- دراسة إمكانية تحليل القمح التركي باستخدام الطرائق المطورة للكشف عن القمح الطري في المعكرونة- أطروحة دكتوراه، معهد الدراسات العلمية، تركيا

٤- العودة كرم، سمينة غياث -١٩٩٨- **كيمياء تحليل الأغذية** - المنظمة العربية للتربية والثقافة والعلوم والمركز العربي للتعريب و للتعريب والترجمة والتأليف والنشر، دمشق.

٥- القليوبي ممدوح حلمي، عبدالله أمين، خلاف مصطفى مجدي -١٩٩٧- **تحليل الأغذية** - كلية الزراعة- جامعة عين شمس.

٦- كف الغزال رامي ، الفارس عباس ، الصالح عبود علاوي -١٩٩٢- **إنتاج وتكنولوجيا محاصيل الحبوب** -كلية الزراعة- جامعة حلب.

٧- الكيالي علي زياد ، عياش علي -١٩٨٦- **أساسيات تصنيع الحبوب ومنتجاتها** - كلية الزراعة - جامعة حلب.

٨- المصري سليمان ، الخياط غسان حمادة -١٩٩١- **كيمياء الحبوب وتصنيعها** - كلية الزراعة جامعة دمشق.

٩- المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ICARDA) بالتعاون مع المؤسسة العامة لإكثار البذار-١٩٩٩- **نموذج عملي للتوصيف المورفولوجي لأصناف القمح والشعير مع أمثلة من سورية**

References

1. ANJUM F. M., LOOKHART G. L., WALKER C. E.,2000- **High-molecular-weight glutenin subunit composition of Pakistani hard white spring wheats grown at three locations for 2 years and its relationship with end-use quality characteristics.** *Journal of the science of Food and Agriculture*,80:219-225.

2. AUTRAN J. C., 1994**- Size-exclusion high-performance liquid chromatography for rapid examination of size differences of cereal proteins. In: High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. J.E. Kruger and J.A. Bietz (Eds.),** *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, Minnesota, USA, 326-372

3. BECCARI., 1745- **De Fmmento.** De Bononiensi Scientiarum et Artium Institute atque Academia Commentarii, II., Part I: 122-127

4. BEKES F., BATEY I L., WRIGLEY C. W., GORE P J, 1991- **Rapid electrophoresis of gliadin protein: Integration of lab tests to efficiently identify wheat varieties . 467-475 in Gluten Proteins 1990 W. Bushuk and R. Thachuk,** eds. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.

5. BIETZ J A., WALL J. S.,1972- **Wheat gluten subunits: Molecular Weight determined by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis**. *Cereal Chemistry*,49:416-430.

6. BIETZ J. A., 1984- **Analysis of wheat gluten proteins by reversed-phase highperformance liquid chromatography**, part I. *Bakers Digest,* 58:15-32

7. BIETZ J. A., 1990- **HPLC of cereal endosperm storage proteins.429-455 In: HPLC of Biological Macromolecules-Methods and Applications.** K.M. Gooding and F.E. Regnier (Eds*.), Marcel Dekker*, New York.

8. BIETZ J. A., BURNOUF T., COBB L. A., WALL J. S., 1984a- **Gliadin analysis by reversed-phase high performance liquid chromatography: optimization of extraction conditions**. *Cereal chemistry*, 61:124-129

9. BIETZ J. A., BURNOUF T., COBB L .A., WALL J. S., 1984b- **Wheat varietal identification and genetic analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography**. *Cereal chemistry*, 61:129-135

10. BRAADBAART F., BERGEN P F., 2005-. **Digital imaging analysis of size and shape of wheat and pea upon heating under anoxic conditions as a function of the temperature.** *Vegetation History and Archaeobotany*, 14:67-75.

11. BRANLARD G., AUTRAN J C., MONNEVEUX P., 1989- **High Molecular Weight Glutenin Subunits in Durum Wheat *(Triticum durum*)**. Theor. Appl.Genet. 78:353-358.

12. BURKE T. W. L., MANT C. T., HODGES R. S., 1991- **The effect of varying flow rate, gradient-rate, and detection wavelength on peptide elution profiles in reversed-phase chromatography. In: C.T. Mant and R.S. Hodges (Eds.), High-performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation.** *CRC Press*, Boca Raton, FL, 307-317.

13. BURNOUF T., BOURIQUET R., 2004- **Glutenin subunits of genetically related European hexaploid wheat cultivars: Their relation to bread-making quality.** *Springer Berlin / Heidelberg,* 58: 107-111

14. BUTOW B .J., GALE K. R., IKEA J., JUHÁSZ A., BEDO Z., TAMÁS L., GIANIBELLI M. C., 2004- **Dissemination of the highly expressed Bx7 glutenin subunit (Glu-B1al allele) in what as revealed by novel PCR markers and RP-HPLC.** *Theoretical and Applied Genetics* 109:1525-1535.

15. CABALLERO L., MARTIN L M., ALVAREZ J. B., 2004- **Variation and genetic diversity for gliadins in Spanish spelt wheat accessions**. *Genetic resources and crop evolution* 51:679-686

16. Canadian Grain Commission-2009-**Classes and varieties Modified: 27-08-2009.**

17. COOKE R. J., ed. 1992- **Electrophoresis Handbook: Variety Identification**. Pages 0-50 in: Handbook of Variety Testing. *International Seed Testing Association*, Zurich, Switzerland.

18. COOKE R J., 1988- **Electrophoresis in plant testing and breeding. 171-261 in: Advances in Electrophoresis** , vol 2. A. *Chrambach et al, eds. VCH Verlagsgesellschaft*, Weinheim, Germany.

19. D'Ovidio R., Masci S., 2004- **The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten**. *Journal of Cereal Science*, 39: 321–339.

20. DAVIES E. R., 2000- **Cereal grain inspection**.:157-184 **in: Image Processing for the Food Industry**. *World Scientific Publishing Co: Singapore*

21. DEWEY, D. R., 1984- **The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridisation with the perennial** *Triticeae. In: Gene Manipulation in Plant improvement***.** Plenum publ .Crop New York

22. DOGRAR N., MAHINUR S. A., 2001- **Optimization of PCR Amplification of Wheat Simple Sequence Repeat DNA Markers.** *Turkey biology,*25:153-158

23. DONG K., HAO C Y., WANG AL., CAI M. H., YAN Y. M., 2009- **Characterization of HMW Glutenin Subunits in Bread and Tetraploid Wheats by Reversed-Phase High-performance Liquid Chromatography.** *Cereal Research Communications*, 37: 65–72.

24. DUNBAR B. D., BUNDMAN D. S., DUNBAR B. S., 1985- **Identification of cultivar-specific proteins of winter wheat** ***(T. aestivum.)*** **by high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and color-based silver stain**. *Electrophoresis* 6:39-43.

25. DUPONTA F. M., ALTENBACH S. B., 2003- **Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis.** *Cereal science*,38:133-146

26. EDURNEA G., MAGDALENA R., ROSARIO F., JOSE M. C., 2006- **Analysis of Genetic Variability in a Sample of the Durum Wheat (*Triticum durum Desf.*) Spanish Collection Based on Gliadin Markers** *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1534-1552

27. EDWARD S L, HILL A S., ASHWORTH P, MATT J L., SKERRITT J H., 1994- **Analysis of the grain- protectant pesticides chlorpyrifos –methyl and methoprene with 15 min Immunossasy for field and elevator use.** *Cereal chemistry*, 70:748-752

28. EINHOF, H. 1805. **Chemische analyse de roggens (Secale cereale*).*** *Neues allgem. J.d. Chem*. 5:131-153

29. ELIASSON A., LARSSON K., 1993- **Cereals in breadmaking, a molecular colloidal approach**. *Marcal Dekker, Inc., New York*

30. EWART J. D., 1973- **Sodium Dodecyl Sulphate Electrophoresis of wheat gliadin**. *Flour Milling and Baking Research Association*,13:685-690.

31. FELDMAN, M. 1976. **Wheats. In Evoliution of crop plants**, *education. Longman Group Limited, England* :120-128

32. FUERST E. P., MORRIS C. F., ANDERSON J. V., 2005- **Polyphenol Oxidase in Wheat Grain: Whole Kernel and Bran Assays for Total and Soluble Activity.** *Cereal Chemistry*, 83: 10–16.

33. FULLINGTON J.G., COLE E.W., KASARDA D.D., 1983-**Quantitative sodium dodecyl sulfate-polyacrlamide gel electrophoresis of total protein extracted from different wheat varieties: effect of protein content.** *Cereal Chemistry*, 60:65-71.

34. GIANIBELLI M. C., LARROQUE O. R., MACRITCHIE F., WRIGLEY C. W., 2001- **Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat endosperm proteins.** *Online review: American Association of Cereal Chemists,*1-20

35. Gupta R. B., Batey I. L., MacRitchie F., 1992- **Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours.** *Cereal Chemistry,*69:125-131.

36. GUPTA R. B., KHAN M., MACRITCHIE F., 1993- **Biochemical basis of flour properties in bread wheat I Effect of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein**. *Cereal Science*, 18:23-41.

37. HALVERSON J., ZELENY L., 1988- **Criteria of wheat quality**. Pages 15-45 **in: Wheat Chemistry and Technology** I (3rd ed.). Y. Pomeranz, ed. *American Association of Cereal Chemists*, Inc.: St. Paul, Minnesota.

38. HAMAUZU Z., ARAKAWA T., YONEZAWA D., 1972- **Molecular weights of glutenin and gliadin polypeptides estimated by SDS-PAGE.** *Agric. Biol. Chem.,*36:1829-1830.

39. HASSAN A E.,HENEIDAK S., GOWAYED S. M, 2007- **Comparative Studies of Some *Triticum* Species by Grain Protein and Amino Acids Analyses.***Journal of Agronomy*,6:286-293.

40. HUEBNER F. R., BIETZ. J. A., 1988- **Quantitative variation among gliadins of wheats grown in different environments**. *Cereal Chemistry*. 65:362-366

41. HUEBNER F. R., BIETZ J. A., 1994- **RP-HPLC for varietal identification in cereals and legumes: Wheat. Pages 97-102 in: High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins**. J. E. Kruger and J. A. Bietz, ed *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul. Minnesota

42. HUEBNER F. R., BIETZ J A., 1995- **Rapid and Sensitive Wheat Protein Fractionation and Varietal Identification by Narrow-Bore Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography,** *Cereal Chemistry*, 72:504-507.

43. JOLLY C. J., RAHMAN S., KORTT A. A., HIGGINS T. J. V**.**, 1993**- Characterization of the wheat Mr 15000 "grain-softness protein" and analysis of the relationship between its accumulation in the whole seed and grain softness,** *Teor Appl Genet*, 86:589-597

44. JONES R W, TAYLOR N. W., SENTI F R., 1959- **Electrophoresis and Fractionation of Wheat gluten.** *Agriculture . Biochemical. Biophysical*, 84:363-376.

45. JONES B.L., LOOKHART G.L., HALL S.B., FINNEY K.F., 1979- I**dentification of wheat cultivars by gliadin electrophoresis: electrophoregrams of the 88 wheat cultivar most commonly grown in the united states in 1979.** *Cereal Chemistry*, 59:181-188.

46. Khan, M. F., 2003. **Evaluation of hexaploid wheat genotypes by using DNA isolation and gel-electrophoresis**. *Asian journal of plant sciences*,2:212-215

47. KOKSEL H., SAPIRSTEIN H.D., GELIK S., BUSHUK W., 1998- **Effects of gamma-irradiation of wheat on gluten proteins.** *Journal of cereal science*, 28:243-250.

48. KONAREV V. G., GAVRILYUK I. P., GUBAEVA N. K., PENEVA T. I., 1979. **Seed proteins in genome analysis, cultivar identification and documentation of cereal genetic resources**. *Cereal Chemistry* 56:272-278.

49. LAFIANDRA D., D. OVIDIO., PORCEDDU R., MARGIOTTA B., COLAPRICO G., 1993. **New data supporting high Mr Glutenin subunit 5 as determinant of quality difference among the pairs 5+10 vs 2+12**.*Cereal Science,*18: 197–205

50. LAFIANDRA D., KASARDA D. D.,1985-**One- and two dimensional (two pH) polyacrylamide gel electrophoresis in a single gel: separation of wheat proteins**. *Cereal Chemistry* 62, 314–319

51. LAMKIN W. M., MILLER B. S., NELSON S. W., TRAYLOR D. D., LEE M. S., 1981- **Polyphenol oxidase activities of hard red winter, soft red winter, hard red spring, white common, club, and durum wheat cultivars.** *Cereal Chemistry*, 58(1):27-31.

52. LAWRENCE G J., SHEPHERD K W., 1980- **Variation in glutenin protein Subunits of wheat**. *Aust. J. Biol. Sci*. 33: 221-233

53. LEAMMLI U. K., 1970- **Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, 227:680-685.

54. LOOKHART G L., FINNEY K F., 1984-**Polyacrylamide Gel Eleclrophoresis of Wheat Gliadins: the Effecl of Environment and Germination** *Cereal Chemistry*,61:496-499

55. LOOKHART G.L., JONES, B.L., HALL, S.B. FINNEY K.F 1982- **An improved method for standardizing polyacrylamide electrophoresis of wheat gliadin proteins.** *Cereal Chemistry*, 59:178-181.

56. MACRITCHIE F., 1984- **Baking quality of wheat flours**. *Advances in Food Nutrition Research,* 29:201-277

57. MACRITCHIE F., 1992- **Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality**. *Advances in Food Nutrition Research* 36, 1-87.

58. MAJUMDAR S., JAYAS D. S., 2000a- **Classification of cereal grains using machine vision**: **I. Morphology models**. *Trans. ASAE* 43:1669-1675.

59. MAJUMDAR S., JAYAS D. S., 2000b- **Classification of cereal grains using machine vision: II. Color models**. *Trans. ASAE* 43, 1677-1680

60. MARCHYLO B. A., KRUGER J. E., 1988- **The effect of injection volume on the quantitative analysis of wheat storage proteins by re versed-phase high-performance liquid Chromatography**. *Cereal Chemistry*. 65:192-198.

61. MASOULEH A. KH.,2005-**Toward a molecular evaluation of grain quality using glutenin subunits in *Triticum carthlicum*.** *African Journal of Biotechnology* 4:346-349.

62. McIntosh R. A., 2004- **Wheat, In: Encyclopaedia of grain science**, Wrigley C., Corke H., Walker C (eds.) North.

63. MENG X. G., GAI S.X.,2008- **Association between glutenin alleles and Lanzhou alkaline stretched noodle quality of northwest China spring wheats. II. Relationship with the variations at the *Glu-1* loci**. *Cereal Research Communication* 36:105-117

64. MIKKELSEN S. R., CORTÓN E., 2004- **Principles of Electrophoresis In**: **Bioanalytical chemistry, John Wiley & Sons** (eds), 167-190, Hoboken, New Jersey

65. MOHD S., ALAM Z., ZAHIR A., WAQAR A., TAUFIQ A., IKHTIAR K., 2007- **Characterization of wheat varieties by seed storage protein electrophoresis.** *international journal of agriculture and biology***,** http://www.fspublishers.org

66. NAEEM H. A.; SAPIRSTEIN H. D., 2007- **Ultra-fast separation of wheat glutenin subunits by reversed-phase HPLC using a superficially porous silica-based column.** *Journal of cereal science***,** 46:157-168.

67. OSBORNE T. B., 1907. **The proteins of the wheat kernel**. *Carnegie Institute.Washington D.C. Publication no*. 84

68. PARMENTIER A. A., 1773- **Examin chimique des pommes de tere, dans lequel on traite des parties constituantes du ble**. Didot le jeaune, Paris.

69. PAYNE P L., 1987 **Genetic of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread making quality**.*Ann Rev.Plant Phisiology* 38:141-153

70. PAYNE P I., LAW C N., MUDD E. E., 1980- Control by homoeologous Group 1 **chromosome of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm**. *Theor. Appl. Genet*. 58: 113-120.

71. PAYNE P I., HOLT L M., JACKSON E A., LAW C N., 1984- **Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding.** *Philosophical Transactions of the Royal Society London*,304: 359–371.

72. PAYNE P. I, LAWRENCE G. L., 1983- **Catalogue of alleles for the complex gene loci,Glu-A_1,Glu-B_1 and Glu-D_1 which code for high-molecular weight subunits of glutenin in hexaploid whea**t. *Cereal Research*,11:29-35.

73. PAYNE P. I., NIGHTINGALE M. A., KRATTIGER A. F., HOLT L. M., 1987- **The relationship between HMW glutenin subunit composition and the breadmaking quality of British-grown varieties**. *Journal of Science of Food and Agriculture,*40:51-65.

74. PAVLOVA A R.,KOZAVKIN S. A., SLESAREV A I, 2004- **Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient application.***trend biotechnology* 22:253-260

75. PENA R. J., ZARCO-HERNANDEZ J., AMAYA-CELIS A., MUJEEB-KAZI., 1994- **Relation between Chromosome 1B encoded Glutenin Subunit Composition and Bread-making Quality Characteristic of Some Durum Wheat Cultivar**. *Cereal science*, 19:243-249.

76. PIAZZI S. E., RIPARBELLI G., SORDI S., CANTAGELLI P., POCCHIARI F., SILANO V., 1972- **Immunochemical characterization of specific albumins of bread wheat**. *Cereal Chemistry*, 49:72-78.

77. PIAZZI S.E., CANTAGALLI P**.,** 1969**- Immunochemical analysis on soluble protein of wheat,** *Cereal chemistry***,** 46:642-646

78. POEHLMAN J M, SLEPER D A., 1995- **Breeding wheat pp: 259-276 In Breeding Field Crops.** 4th ed *Iowa State University Press*, Ames,IA

79. PONGA N.E., DAL BELIN PERUFFO A., BOGGINI G., CORBELLINI M., 1982- **Analysis of wheat varieties by gliadin electrophoregrams**. *Genetic Agriculture*, 36:143-154.

80. POMERANZ Y., 1988- **Composition and Functionality of wheat flour components** 97-158 **in: Wheat chemistry and technology.** 2rd ed *American Association of Cereal Chemists*, Minnesota, USA.

81. QIAN Y., PRESTON K., KROKHIN O., MELLISH J., ENS W., 2008. **Characterization of wheat gluten proteins by HPLC and MALDI TOF mass spectrometry.** *J Am Soc Mass Spectrom*, 10, 1542-50**.**

82. RAKSZEGI M., BÉKÉS F., LÁNG L., TAMÁS L., SHEWRY P.R., BEDÖ Z., 2005- **Technological quality of transgenic wheat expressing an increased amount of a HMW glutenin subunit.** *Journal of Cereal Science***,** 42:15-23.

83. RASHED M. A., ABOU-DEIF M. H., SALLAM M. A. A., RIZKALLA A A., RAMADAN W. A.., 2007**- Identification and Prediction of the Flour Quality of Bread Wheat by Gliadin Electrophoresis, Journal of Applied Sciences Research, 3, 1393-1399.**

84. ROBERT L., CLEMENT S., 1987- **A study of gliadins of soft wheats from the eastern united states using a modified polyaerylamide gel electrophoresis procedure.** *Cereal Chemistry*, 64:442-448

85. SAPIRSTEIN H. D., KOHLER J. M., 1995- **Physical uniformity of graded railcar and vessel shipments of Canada Western Red Spring wheat determined by digital image analysis**. *Canadian Plant Science*,75:363-369.

86. SARA B. G., 2006- **The relationship of protein composition to end-product functionality of hard white Wheat.** *Thesis Oregon state university*

87. SARKAR P., STEBBINS G. L., 1956- **Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat**. Am. J. Bot,43:297-304.

88. SAX, K., 1918- **The behaviour of chromosomes in fertilization**. *Genetics* 3:309-327.

89. SCHEROMM P., MARTIN G., BERGOIN A., AUTRAN J. C., 1992- **Influence of nitrogen fertilization on the potential bread-baking quality of two wheat cultivars differing in their responses to increasing nitrogen supplies.** *Cereal Chemistry*, 69:664-670.

90. SHAHNEJAT-BUSHEHRI A. A., GOMARIAN M., YAZDI S.B., 2006- **The high molecular weight glutenin subunit composition in old and modern bread wheats cultivated in Iran.** *Australian journal of agricultural research*, 57:1109-1114.

91. SHEWRY P. R., LOOKHART G L.,2003- **Wheat gluten protein analysis**. *American Association of Cereal Chemists*, Minnesota, USA 1-15.

92. SHEWRY P. R., NAPIER J.A., TATHAM A. S., 1995- **Seed storage proteins: structures and biosynthesis**. *Plant Science* 7, 245-256

93. SHEWRY P.R., TATHAM A.S., 1990- **The prolamin storage proteins of cereal seeds: Structure and evolution.** *Biochemical Journal*,106:1-12

94. SKERRITT J. H**.,** 1995- **Variety identification by immunological analysis, In Identification of food grain varieties, (Colin W. Wrigley Eds),** *The American association of cereal chemists*, Inc., USA, 151-173.

95. SOUTHAN M., MACRITCHIE F., 1999- **Molecular weight distribution of wheat protein**. *Cereal Chemistry*,76:827-837

96. SYMONS S. J., FULCHER R. G., 1988a- **Determination of wheat kernel morphological variation by digital image analysis: I. Variation in eastern Canadian miling quality wheats**.*Cereal Science*, 8:211-218.

97. SYMONS S. J., FULCHER R. G., 1988b- **Determination of wheat kernel morphological**: **Variation by digital image analysis**: **II Variation incultivars of soft white winter wheats**. *Cereal Science*, 8: 219-229.

98. TADDEI G, 1819- **Ricerche sul glutine del frumento**. Giornale di fisica, chimica, estoria naturale, Brugnatelli, 2:360-361

99. TAHIR N. A. R., 2008- **Characterization and glutenin diversity in tetraploid wheat varietiesin Sulaimanyah by wheat storage proteins**. *African Journal of Biotechnology*,7: 4031-4036.

100. THOMSON W. H., POMERANZ Y., 1991- **Classification of wheat kernels using three-dimensional image analysis**. *Cereal Chemistry*, 68:357-361.

101. TSUNEWAKI K., YAMADA S., MORI N., 1990- **Genetical studies on a Tibetan semi-wild wheat, *Triticum Aestivum ssp. Tibetanum*.Jpn**. *Genetics* 65:353-327

102. VAZQUEZ V., 2000. **Effects of Genotype and Environment on Polyphenol Oxidase Activity and Related Properties of Red and White Wheats**. *Thesis, University of Manitoba, Canada*.

103. WIESER H., SEILMEIER W., BELITZ, H. D., 1994- **Use of RP-HPLC for a better understanding of the structure and functionality of wheat gluten proteins. In: High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. J.E. Kruger and J.A. Bietz (Eds.),** *American Association of Cereal Chemists*,St.Paul, MN, 235-272.

104. WOYCHIK J. H., BOUNDY J. A., DIMLER R. J., 1961- **Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea.** *Archives Biochemistry and Biophysics* 94:477-482.

105. WOYCHIK J. H., HUEBNER F. R., DIMLER R. J., 1964- **Reduction and Starch gel electrophoresis of wheat gliadin and glutenin.** *Archives Biochemistry and Biophysics* 105:151-155.

106. WRIGLEY C W., BATEY I. L., 1995- **Efficient Strategies for variety identification.19-35 in:Identification of Food-Grain Varieties.** Wrigley c w**.,**(Eds) *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, Minnesota**.**

107. WRIGLEY C W., BUSHUK W., 1971- **Effect of rust infection on marquis wheat grain proteins.** *Photochimstry*, 10:975-978.

108. WRIGLEY C. W., ANDREWS J. L., BEKES F., GRAS P. W., GUPTA R. B., MACRITCHIE F., SKERRIT J. H., 1998- **In: Interactions: The Keys to Cereal Quality**. R.J.Hamer and R.C. Hoseney (Eds.), *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, Minnesota:17-48.

109. WRIGLEY C. W., AUTRAN J. C., BUSHUK, W., 1982- **Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins**, 211-257, **Advances in Cereal Science and Technology** Volume V, Pomeranz, Y., (Ed.), *American Association of Cereal Chemists Incorporated* St. Paul, Minnesota

110. WRIGLEY C. W., BIETZ J. A., 1988- **Proteins and amino acids**. Pages 159-275 **in: Wheat Chemistry and Technology**, vol. 1. Y. Pomeranz, ed. *American Association of Cereal* Chemists, St. Paul, Minnesota

111. Z1LLMAN R.R., BUSHUK W., 1979a- **Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams: Catalogue of electrophoregram formulas of Canadian Wheat Cultivar.** *Plant Science*, 59:287-298.

112. Z1LLMAN R.R., BUSHUK W., 1979b- **Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams: Effects of Environmental and experimental factors on the gliadin electrophoregram**. *Plant Science*, 59:299-311.

113. ZADE, A., 1914. **Serologische studien an leguminosen und gramineen.** *Z. Plflanzenuecht*, 2: 101-151.

114. ZAYAS I. Y., MARTIN C. R., STEELE J. L., KATSEVICH A., 1996- **Wheat classification using image analysis and crush-force parameters**. *Cereal Chemistry*,39:32-36.

115. ZAYAS I., LAI F. S., POMERANZ, Y., 1986- **Discrimination between wheat classes and varieties by image analysis**. *Cereal Chemistry*, 63: 52-56.

116. ZOHARY D., HOPF M.,1993-**Domestication of plants in the old world**. *Oxford University Press*.